



Filipe da Silveira Martins

Licenciado em Química Aplicada

**Desenvolvimento de um novo método de
produção de sumo de maçã visando
incrementar o teor em polifenóis e diminuir
o escurecimento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012



Filipe da Silveira Martins

Licenciado em Química Aplicada

Desenvolvimento de um novo método de produção de sumo de maçã visando incrementar o teor em polifenóis e diminuir o escurecimento

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012

COPYRIGHT

Desenvolvimento de um novo método de produção de sumo de maçã visando incrementar o teor em polifenóis e diminuir o escurecimento Copyright © em nome de Filipe da Silveira Martins, aluno da FCT/UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de formato digital, ou de qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos que apresento de seguida, dirigem-se a pessoas que de algum modo contribuíram para que fosse possível alcançar os objectivos que me propus com esta dissertação. Algumas destas pessoas colaboraram diretamente neste trabalho, através de reuniões realizadas na FCT e no IICT enquanto outras contribuíram simplesmente com a sua boa vontade, amizade e afecto. Assim sendo, os meus agradecimentos são para:

A Professora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, que como orientadora desta dissertação, além de me transmitir os conhecimentos necessários para efetuar este trabalho de investigação, me orientou em relação à recolha e gestão de toda a informação disponível sobre o objeto da pesquisa. Quero também agradecer a sua pronta disponibilidade, amizade e incentivo que sempre me deu desde que a conheci como professora da disciplina de Ecotoxicologia do Mestrado de Tecnologia e Segurança Alimentar e em especial ao longo destes últimos meses;

Ao Doutor António Eduardo Leitão, do Instituto de Investigação Científica Tropical, quero agradecer toda a disponibilidade na colaboração com as análises cromatográficas essenciais para esta dissertação.

À Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por ter proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Doutora Cármen Pinheiro pelas sugestões dadas na estruturação deste trabalho.

Para toda a minha família que sempre me apoiou durante a realização do Mestrado, em especial à minha mãe Olga Maria da Silveira Martins.

Quero ainda agradecer a todos os professores do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar de 2010/2012, pela disponibilidade e pelos conhecimentos que me transmitiram.

RESUMO

A crescente procura por sumos com menor grau de processamento e elevado valor nutricional, ricos em compostos bioativos e com propriedades sensoriais próximas da fruta fresca, tem motivado a procura de novos métodos de produção que permitam obter sumos com estas características e com longo período de vida útil. Neste trabalho testaram-se diferentes métodos de produção de sumo de Maçã *Golden Delicious* tendo em vista o incremento do teor em polifenóis e a redução do escurecimento. Os resultados foram comparados com um sumo obtido através de um processo convencional. Dos métodos testados aquele em que realizou um escaldamento prévio da fruta e trituração com ácido ascórbico foi o que obteve resultados mais satisfatórios.

O novo método garantiu a inativação enzimática completa e um teor em polifenóis significativamente superior ao do sumo convencional. Este sumo apresentou-se microbiologicamente estável durante um período de conservação de dois meses, mesmo quando pasteurizado a uma temperatura inferior à do método convencional (65°C contra 90°C). O escurecimento não enzimático a quando da produção foi reduzido em cerca de 56% embora tenha continuado a desenvolver-se durante o armazenamento a 4 ou a 25 °C.

Concluiu-se que o novo método permite obter um sumo de maçã com valor nutricional significativamente melhor que o sumo produzido pelo método convencional com menos passos de produção e temperaturas mais baixas de tratamento.

Palavras-Chave: Sumo de maçã, polifenol oxidase, pasteurização, antioxidantes, polifenóis, conservação.

Abstract

The growing demand for unprocessed fruit juices with higher nutritional values, bioactive compounds and with sensory properties closer to those of the fresh fruit, has triggered the search of new methods of juices production that result in juices with these characteristics and with long shelf lives. In this study we have tested different juice production methods using *Golden Delicious* apples, focusing on the increment of the phenolic compounds content and reduced browning. These results were compared with the juice produced under the conventional method. The juice that was extracted with the blanching of the whole apples and grinding with the ascorbic acid solution showed the best results.

The new method ensured a complete enzymatic inactivation and phenolic content significantly higher than the juice produced under the conventional method. This juice was microbiologically stable during the two month study even for the juice preserved at room temperature after pasteurization at 65 °C. The non enzymatic browning was 56 % lower than the juice produced under the conventional method, although, during the preservation all the juices darkened both at 4 and 25 °C.

In conclusion the new method results in an apple juice with higher nutritional value, better sensory properties and less processing steps than that produced under the conventional methods.

Keywords: Apple juice, polyphenol oxidase, pasteurization, antioxidant, polyphenols, conservation.

ÍNDICE

Introdução	1
1. Sumos de Maçã: Aspectos Funcionais, Nutricionais e Tecnológicos.....	3
1.1 Maçã e os seus benefícios para a saúde	3
1.2 Polifenóis	4
1.3 Polifenóis na maçã.....	13
1.4 Produção e qualidade do sumo de maçã	18
1.5 Métodos alternativos de produção de sumo de maçã.....	26
2. Material e Métodos.....	29
2.1 Amostra	29
2.2 Reagentes e meios de cultura.....	29
2.3 Preparação do sumo de maçã.....	29
2.4. Otimização da temperatura de pasteurização.....	32
2.5. Rendimento da extração	33
2.6. Determinação da atividade da polifenol oxidase (PPO)	33
2.7. Determinação dos polifenóis totais.....	33
2.8. Determinação do perfil fenólico	34
2.9. Determinação do escurecimento não enzimático - determinação de HMF.....	35
2.10. Análise microbiológica.....	35
2.11. Análise Estatística	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. Escolha do melhor método de preparação do sumo.....	37
3.2. Otimização da temperatura de pasteurização.....	41
CONCLUSÃO	50
BIBLIOGRAFIA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura base dos flavonóides composta por dois anéis benzénicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C)	5
Figura 1.2: Estruturas básicas dos principais grupos fenólicos nas frutas e vegetais	5
Figura 1.3: Metabolismo fenólico, PEP (fosfoenol piruvato); E4P (eritrose 4-fosfato); DAHP (3Deoxi-D-arabino-heptulose 7-fosfato); PAL (Fenilalanina amónia liase) . O <i>stress</i> ativa transcripcionalmente as enzimas chave do metabolismo fenólico (PAL e DAHP sintetase)	7
Figura 1.4: Inter-relações entre classes de flavonóides. As setas indicam o principal caminho biossintético).....	8
Figura 1.5: Mecanismos de lesão celular associados ao <i>stress</i> oxidativo	12
Figura 1.6: Estrutura química dos flavonóis quercetina e caempferol	14
Figura 1.7: Estrutura química dos derivados glicosilados da quercetina e caempferol encontrados nas maçãs	14
Figura 1.8: Estrutura química das procianidinas e dos seus precursores encontrados nas maçãs	15
Figura 1.9: Estrutura química de um derivado do ácido hidroxicinâmico encontrado nas maçãs	15
Figura 1.10: Estruturas químicas das dihidrocalconas encontradas nas maçãs	16
Figura 1.11: Estrutura química de um pigmento de antocianidina	16
Figura 1.12: Diagrama de produção de concentrado de maçã	19
Figura 1.13: Reações catalisadas pelas polifenoloxidasas cresolase (E.C.1.14.18.1), catecoloxidase (E.C.1.10.3.1) e lacase (E.C.1.10.3.2)	22
Figura 1.14: Formação de pigmentos escuros por oxidação dos polifenóis	22
Figura 1.15: Formação de pigmentos escuros por oxidação dos polifenóis	23
Figura 1.16: Esquema da reacção de Maillard	25
Figura 2.1: Fluxograma de extração e análise do sumo de maçã	30
Figura 3.1: Curvas de variação da absorvância a 420 nm com o tempo obtidas no ensaio da actividade da PPO no sumo controlo (sem nenhum tipo de tratamento) e nos sumos obtidos pelos quatro métodos experimentais utilizados.....	38
Figura 3.2: Actividade da enzima polifenol oxidase (U/mL) no sumo controlo (sem nenhum tipo de tratamento) e nos sumos obtidos pelos quatro métodos experimentais utilizados.....	38
Figura 3.3: Concentração dos compostos fenólicos totais no sumo controlo (sem nenhum tipo de tratamento) e nos sumos obtidos pelos quatro métodos experimentais utilizados.....	39
Figura 3.4: Teor em polifenóis dos sumos imediatamente após pasteurização às diferentes temperaturas (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).....	42
Figura 3.5: Variação percentual em relação ao valor imediatamente após a pasteurização do teor em polifenóis dos sumos imediatamente ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).....	43
Figura 3.6: Teor em ácido clorogénico (mg/L) nos sumos antes e imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a	

25°C)	44
Figura 3.7: Teor em epicatequina (mg/L) nos sumos antes e imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C)	45
Figura 3.8: Teor em quercetina 3-β-D-glucosido (mg/L) nos sumos antes e imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).....	46
Figura 3.9: Aspecto dos sumos imediatamente após a sua pasteurização. M ₁ (90°C): Sumo preparado pelo método 1 e pasteurizado a 90°C; M ₄ (65°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 65°C; M ₄ (75°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 75°C; M ₄ (90°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 90°C.....	46
Figura 3.10: Aspecto dos sumos após dois meses de armazenamento a 4°C e a 25°C. M ₁ (90°C): Sumo preparado pelo método 1 e pasteurizado a 90°C; M ₄ (65°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 65°C; M ₄ (75°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 75°C; M ₄ (90°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 90°C.....	47
Figura 3.11: Teor em HMF (mg/L) nos sumos imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).....	47
Figura 3.12: Aumento percentual de HMF entre o dia da produção e os dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).....	49

Simbologia e Notações

DAHP - 3-deoxi-D-arabino-heptulossonato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

g – Aceleração gravítica

HAT – “Hydrogen atom transfer” (transferência de um átomo de hidrogénio)

HMF - Hidroximetilfurfural

HPLC - Cromatografia líquida de elevada eficiência

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

MDA - Malonildialdeído

PAL - Fenilalanina amoníaco-liase

PPO - Polifenol oxidase

ROS - Espécies Reactivas de Oxigénio

SET – “Single electron transfer” (transferência de um electrão)

TBA – Ácido tiobarbitúrico

Introdução

Existe, atualmente, uma procura crescente por sumos de fruta que tenham o mínimo grau de processamento e que conservem as propriedades sensoriais da fruta que os originou. No entanto, por questões de rentabilidade, e devido a sazonalidade da fruta, esta deve passar por um processamento que permita longos períodos de vida útil dos sumos produzidos, sendo que, esse tratamento, pode resultar em perdas nutricionais e sensoriais independentemente da tecnologia utilizada.

Um parâmetro essencial para a produção de sumos de vida útil longa é a estabilidade microbiológica e para que um sumo seja estável durante seis a doze meses ele deve passar por uma pasteurização à temperatura de 90 °C durante 30 a 60 segundos (Aguilar-Rosas *et al.*, 2007). A estas temperaturas podem perder-se compostos voláteis, vitaminas, em especial o ácido ascórbico, e polifenóis, estão favorecidas as reacções de escurecimento não enzimático (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000; Zhu *et al.*, 2009; Patras *et al.*, 2010) podendo, assim, ocorrer o aparecimento de sabores e aromas não-naturais (Kato *et al.*, 2003). Além disso, durante a trituração das maçãs dá-se a ativação da enzima polifenol oxidase. Esta enzima é responsável pela degradação e perda dos polifenóis e, de forma indireta, de ácido ascórbico, podendo estar a sua actividade associada a alterações sensoriais que incluem a evolução de aromas não naturais (Komthong *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007).

Os efeitos negativos do processamento dos sumos de fruta não terminam na sua produção, pois as perdas nutricionais de propriedades bioativas e de qualidade sensorial podem prolongar-se durante a fase de armazenamento. Durante este período podem ocorrer reacções de degradação dos polifenóis, responsáveis por grandes perdas destes compostos, e, especialmente no caso dos concentrados de sumo, reacções de escurecimento não enzimático muito acentuadas, que, conforme já foi referido anteriormente, levam à degradação das qualidades sensoriais do sumo bem como à evolução de aromas não naturais (Burdulu & Karadeniz, 2003).

Assim, a procura de uma forma de conseguir produzir sumos que conservem melhor as propriedades sensoriais da fruta que os originou, ou seja, que não apresentem tantas alterações nutricionais e sensoriais, tem motivado um grande investimento no desenvolvimento de novas tecnologias de processamento da fruta para produção de sumos, das quais se destacam as tecnologias recorrendo ao uso de campos elétricos pulsados e ao uso de hiperpressões (Aguilar-Rosas *et al.*, 2007; Suárez-Jacobo *et al.*, 2011). No entanto, depois de muitos anos de investigação e implementação, os sumos tratados por estas tecnologias não apresentam uma estabilidade microbiológica tão grande como os sumos tratados termicamente. Mais ainda, estes sumos possuem elevada atividade da enzima polifenol oxidase apresentando, por isso, perdas de polifenóis e ácido ascórbico e alterações sensoriais tendo como única vantagem o facto de terem menores perdas de compostos voláteis que, no entanto, são na maioria dos casos substâncias sem interesse nutricional (Aguilar-Rosas *et al.*, 2007; Suárez-Jacobo *et al.*, 2011). Assim, estes sumos apresentam níveis

elevados de escurecimento enzimático, devem estar sempre sob refrigeração e têm prazos de validade reduzidos (normalmente inferiores a um mês) quando comparados com os sumos pasteurizados.

Neste contexto, o desenvolvimento de novos métodos de extracção de sumo a partir de maçãs, que permitam obter sumos microbiologicamente estáveis com elevada qualidade nutricional e sensorial e elevado teor em compostos bioativos, surge como um desafio pleno de interesse, uma vez que a combinação de todas estas qualidades, apenas se encontra nos sumos que são produzidos e consumidos imediatamente a seguir a sua produção.

O presente trabalho surge, assim, no âmbito da necessidade de criar um novo método de produção de um sumo de maçã que permita manter as suas características o mais próximo possível do fruto original, de modo a obter um sumo com elevada qualidade nutricional e sensorial e elevado teor em compostos bioativos e que ao mesmo tempo preencha os requisitos de segurança alimentar. A maçã foi o fruto escolhido pelo facto de, além de ser um fruto com muitos benefícios para a saúde, também ser dos frutos mais produzidos e com maior suscetibilidade a deterioração.

Para conseguir alcançar este objetivo testaram-se três métodos diferentes de extração do sumo de maçã e, seguidamente, três temperaturas diferentes de pasteurização. O melhor método de extracção foi seleccionado com base em dois critérios: Em primeiro lugar a avaliação da eficiência na inativação enzimática da polifenol oxidase, que, conforme já referido anteriormente, é uma das principais responsáveis pela degradação dos compostos bioativos do sumo de maçã; e como segundo critério a concentração em compostos fenólicos totais dos sumos. O sumo produzido pelo método de extracção seleccionado foi sujeito a um processo de pasteurização a três diferentes temperaturas, tendo cada uma destas amostras, sido, posteriormente, avaliada em relação à sua estabilidade microbiológica, concentração em compostos fenólicos e extensão das reacções de escurecimento não enzimático. Esta avaliação foi efectuada no próprio dia da produção e durante um período de conservação de dois meses, tendo as amostras de sumo sido armazenadas paralelamente a 4 e 25 °C.

A escolha da pasteurização como método para estabilizar microbiologicamente as amostras prendeu-se com o facto dos polifenóis, compostos de grande relevância para as propriedades bioactivas das maçãs, apresentarem, de um modo geral, uma elevada estabilidade térmica. Uma das excepções a esta regra são as antocianinas que se começam a degradar a partir dos 60°C (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000; Patras *et al.*, 2010). Por outro lado, as temperaturas de pasteurização ensaiadas foram seleccionadas de forma a minimizar o impacte deste processo quer no perfil de compostos voláteis, quer na extensão das reacções de Maillard, responsáveis pelo escurecimento não enzimático, que também contribui para a degradação da qualidade do sumo de maçã (Zhu *et al.*, 2009).

1. Sumos de Maçã: Aspectos Funcionais, Nutricionais e Tecnológicos

1.1 Maçã e os seus benefícios para a saúde

A maçã é o fruto pomáceo da macieira, árvore da família *Rosaceae* e do género *Malus*. As maçãs crescem em árvores de folha caduca que florescem na Primavera e produzem fruto no Verão ou no Outono. A árvore é originária da Ásia Ocidental, onde o seu ancestral selvagem, *Malus sieversii*, ainda é encontrado atualmente. As maçãs cultivam-se há milhares de anos na Ásia e Europa, tendo sido levadas para a América do Norte pelos colonizadores europeus (Luby, 2003). São hoje conhecidas mais de 10 000 variedades diferentes de maçãs, embora apenas uma muito pequena percentagem destas seja produzida e comercializada à escala global (Hampson & Kemp, 2003). Em termos de produção, em Portugal destacam-se as variedades Golden delicious, Gala, Starking, Reineta, Granny Smith, Jonagold, Fuji, e Bravo de Esmolfe.

A maçã é um fruto com elevado conteúdo em água (cerca de 82,9g/100g), contendo cerca de 57 kcal/100g (média de seis variedades) fornecidas maioritariamente por açúcares cujo perfil é variável em função da variedade de maçã. A maçã possui fibra e por ter um valor negligenciável de gordura é um alimento de eleição nas dietas de emagrecimento. Este fruto contém quase todas as vitaminas e minerais, destacando-se o ácido ascórbico, o α -tocoferol e o ácido pantoténico entre as vitaminas e o potássio entre os minerais. Este fruto tem ainda demonstrado possuir um elevado conteúdo em compostos fenólicos (Martins, 2007; Feliciano *et al.*, 2010).

Diversos ensaios epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que o consumo de maçãs pode ter efeitos benéficos para a saúde humana a vários níveis, destacando-se:

a) Redução do colesterol

O consumo regular de maçãs leva à redução de colesterol no sangue por duas vias principais. Por um lado, a maçã é rica em fibras que inibe a absorção intestinal e favorece a excreção biliar do colesterol (Séjourné, 2009) e, por outro, é rica em polifenóis que reduzem os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no plasma (Aprikian *et al.*, 2001).

b) Redução da hipertensão

A maçã é rica em potássio que favorece a excreção do sódio reduzindo a retenção de líquidos e por consequência, a pressão arterial. Além disso, o facto de inibir a absorção de gorduras e de ajudar no controlo do colesterol tem um efeito indireto positivo no controlo da hipertensão arterial (McGuire, *et al.*, 2005).

c) Doenças cardiovasculares e diabetes tipo-2

Estudos epidemiológicos associam o consumo da maçã a uma redução de risco de doenças cardiovasculares o que é justificado pelo seu elevado teor em polifenóis com uma elevada atividade antioxidante. Assim, estes compostos parecem ser capazes de inibir a oxidação das LDL e a consequente deposição nas artérias, evitando, assim, a aterosclerose. Como resultado, existe uma melhoria na circulação sanguínea reduzindo, consequentemente, o trabalho cardíaco e aumentando a vida útil do coração. A maçã inibe também a absorção da glucose e tem um efeito de controlo do apetite, graças ao seu teor em fibra, o que leva a que o consumo deste fruto esteja associado a uma redução de risco de diabetes tipo 2. Também o facto de contribuir para o controlo da hipertensão e da obesidade, que são factores de risco para o surgimento da diabetes tipo 2, leva a que a incidência desta doença em pessoas que consomem regularmente esta fruta, seja inferior (Boyer & Liu, 2004).

d) Obesidade

A maçã é recomendada nas dietas de emagrecimento pois o seu elevado teor em fibra e fitosteróis inibe a absorção de gorduras e colesterol e favorece uma sensação de saciedade (Oliveira, *et al.*, 2003).

e) Cancro

A maçã é rica em polifenóis que, pela sua atividade antioxidante bem como por outras vias que serão mais à frente abordadas, pode reduzir a incidência do cancro, em particular do cancro do pulmão, como comprovam diversos estudos epidemiológicos (Boyer & Liu, 2004). *In vitro*, extractos preparados a partir de maçãs ou alguns dos compostos fenólicos presentes nestes frutos têm demonstrado uma potente actividade antiproliferativa em linhas celulares humanas de carcinoma do cólon (HT29), cancro gástrico humano (MKN45) e células leucémicas (HL-60) (Serra *et al.*, 2010). A esta actividade antiproliferativa soma-se uma atividade antioxidante que pode ajudar a prevenir as lesões oxidativas no ácido desoxirribonucleico (DNA), bem como a oxidação de lípidos, da qual pode resultar a produção de compostos capazes de causar diversos danos celulares, possuindo alguns deles, como, é o caso do malonildialdeído (MDA), actividade cancerígena em ratos e mutagénica em células bacterianas e de mamíferos (Chung *et al.*, 1996).

1.2 Polifenóis

1.1.1. Definição e classificação

Muitos dos efeitos benéficos para a saúde que têm vindo a ser associados ao consumo de maçãs parecem resultar do conteúdo em polifenóis que estes frutos apresentam. Os polifenóis formam uma das principais classes de metabolitos secundários das plantas, com uma variada gama de estruturas e funções, que incluem sempre pelo menos um anel aromático com um ou mais

constituintes hidroxilos. Esta definição não é completamente satisfatória visto que inclui compostos como a oestrona, uma hormona sexual feminina com origem terpenóide. Por esta razão a definição baseada na origem metabólica é preferível, sendo os fenóis vegetais vistos como substâncias derivadas da via de chiquimato e do metabolismo fenilpropanóide. Alguns são caracterizados como polifenóis, embora nem todos sejam derivados polihidroxilados (Robards *et al.*, 1999).

Os polifenóis que mais se encontram na fruta e vegetais estão divididos em cinco grupos, sendo que os três primeiros se incluem no grande grupo dos flavonóides (Figuras 1.1 e 1.2) (Tomás-Barberán *et al.*, 2000):

- Flavonóis - derivados de 2-fenilcromen-4-ona.
- Pigmentos antocianidinas – derivados do ião flavinium ou 2-fenilcromelinium.
- Flavan-3-ol ou flavanóis – derivados de 2-fenil-3,4-diidro-2H-cromen-3-ol.
- Ácidos hidroxicinâmicos – derivados hidroxilados do ácido cinâmico.
- Ácidos hidroxibenzóicos - derivados hidroxilados do ácido benzóico.

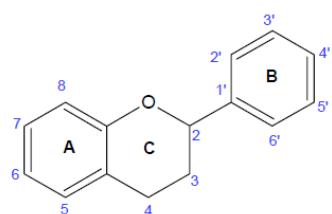


Figura 1.1: Estrutura base dos flavonóides composta por dois anéis benzênicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C) (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

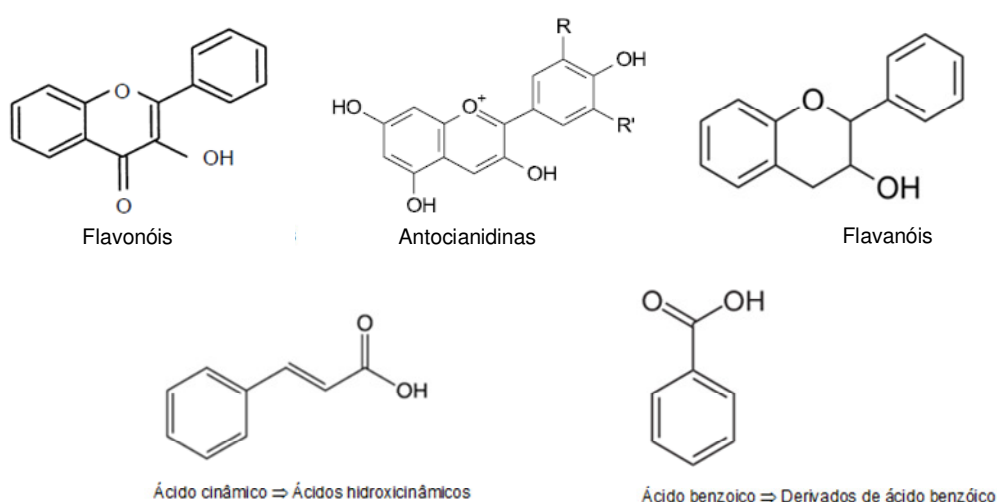


Figura 1.2: Estruturas básicas dos principais grupos fenólicos nas frutas e vegetais (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

Outros polifenóis menores incluem: cumarinas nos citrinos, calconas no tomate, dihidrocalconas na maçã, furocumarinas no aipo e estilbenos como o resveratrol nas uvas (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

1.1.2. Biossíntese dos polifenóis

Os compostos fenólicos fazem parte de um grande grupo de metabolitos secundários que são biossintetizados a partir de glúcidos através da via do ácido chiquímico. Esta é a via biossintética para os aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano e apenas ocorre em microrganismos e plantas (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). No primeiro passo, o intermediário glicolítico fosfoenol piruvato e o intermediário eritrose-4-fosfato são condensados formando 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato (DAHP), um passo catalisado pela DAHP sintetase. Esta enzima regula o fluxo de carbono na via de chiquimato. Diferentes factores bióticos, tais como infecções por microrganismos, ou abióticos, tais como, os ferimentos mecânicos, causam condições de *stress* na planta e induzem a expressão da enzima DAHP sintetase e, por consequência, a biossíntese dos metabolitos fenólicos.

Os intermediários da via de chiquimato são 3-desidroquinato, chiquimato e corismato. O quinato é produzido a partir do 3-desidroquinato e incorporado em ácidos clorogénicos e isoclorogénicos (ácidos cafeoilquínicos) por combinação com o ácido cafeico. O ácido gálico é produzido a partir do chiquimato. A fenilalanina é biossintetizada a partir do corismato e da fenilalanina é formado o ácido cinâmico do qual derivam todos os fenilpropanóides. A formação do ácido cinâmico a partir da fenilalanina é mediada pela ação da enzima fenilalanina amonia-liase (PAL), que faz a ligação entre metabolismo primário (via do chiquimato) e secundário (formação dos compostos fenólicos) (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). Vários fenilpropanóides simples (C6-C3) são produzidos a partir do ácido cinâmico através de uma série de reações de hidroxilação, metilação e desidratação; originando os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico e sinapico e cumarinas simples (Figura 1.3). Os ácidos livres raramente se acumulam nas células vegetais, encontrando-se, geralmente, conjugados com açúcares ou com ácidos orgânicos (quínico, málico, tartárico, etc.).

Do ácido cinâmico são sintetizados os álcoois cumarílicos cuja polimerização origina a lenhina. Um grande número de polifenóis são derivados do esqueleto flavonóide C15, que é sintetizado via condensação da p-cumaroil-coenzima A com três moléculas de malonil-CoA catalisada pela calcona sintetase (CHS). Na maior parte das famílias das plantas, o produto inicial desta reação é a tetrahydrochalcona, que depois é convertida em outras classes de flavonóides como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (Figura 1.4) (Rice-Evans *et al.*, 1997; Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

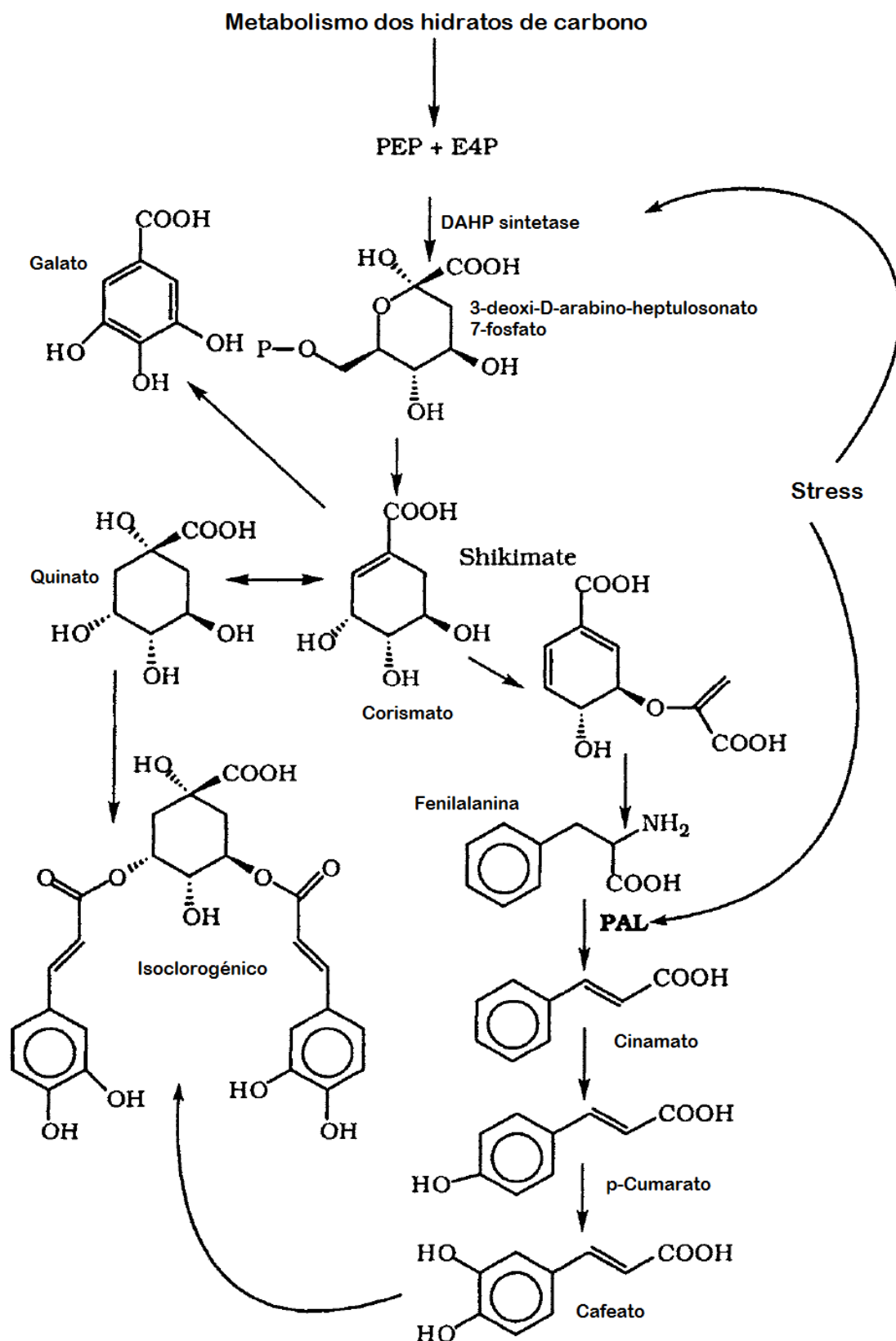


Figura 1.3: Metabolismo fenólico, PEP (fosfoenol piruvato); E4P (eritrose 4-fosfato); DAHP (3Deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato); PAL (Fenilalanina amónia liase). O *stress* ativa transcripcionalmente as enzimas chave do metabolismo fenólico (PAL e DAHP sintetase) (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

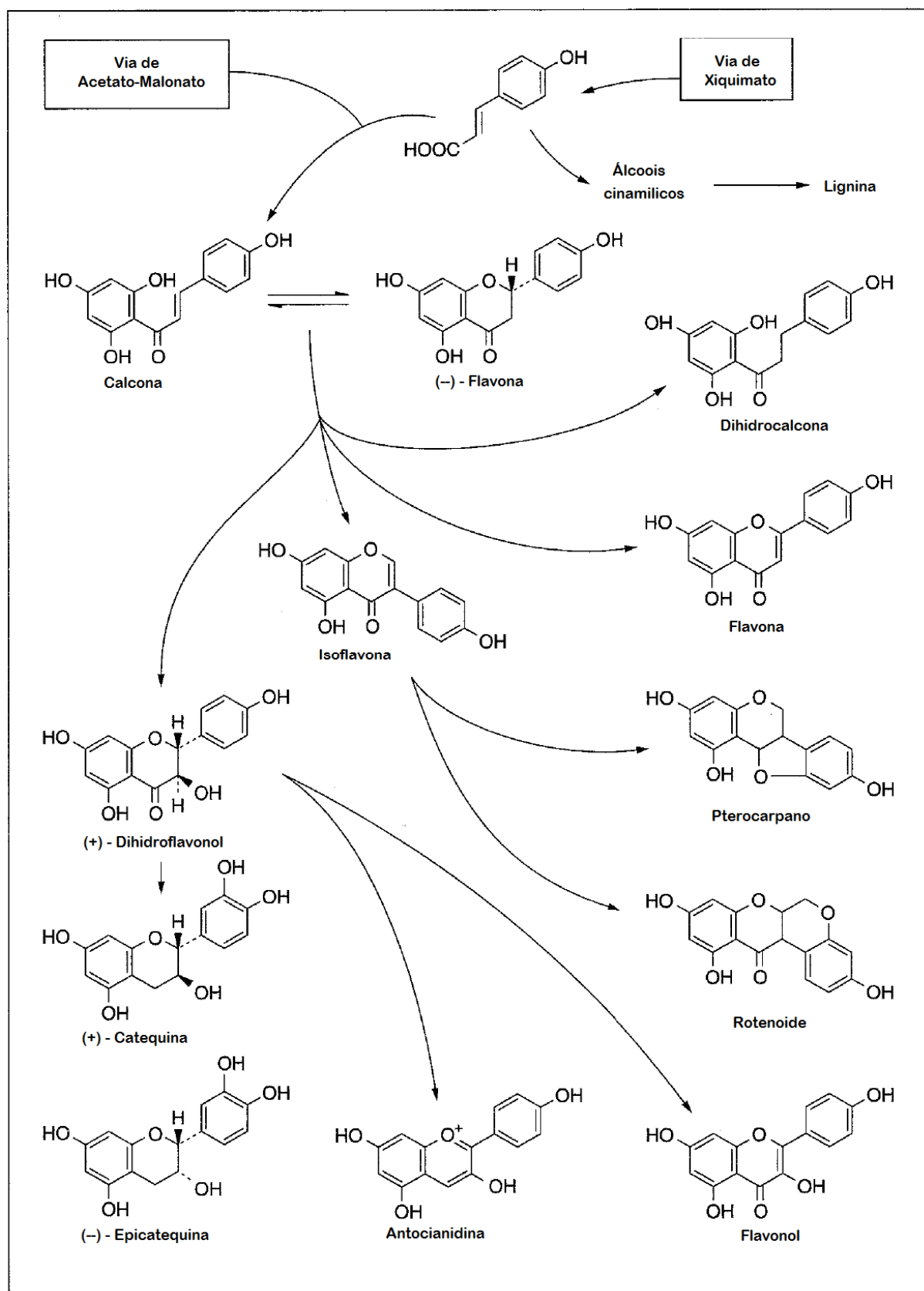


Figura 1.4: Inter-relações entre classes de flavonóides. As setas indicam o principal caminho biossintético (Rice-Evans *et al.*, 1997).

1.1.3. Atividade antioxidante dos polifenóis

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, presente em baixas concentrações, quando comparado com a concentração do substrato oxidável, inibe ou atrasa significativamente a oxidação do substrato, protegendo os alvos biológicos (Halliwell *et al.*, 1995). Existem, aproximadamente, 5000 polifenóis com atividade antioxidante comprovada, embora com grandes variações de eficiência entre os diferentes compostos (Robards *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002). A actividade antioxidante exercida pelos polifenóis pode resultar de diferentes mecanismos (Halliwell *et al.*, 1995; Prior *et al.*, 2005):

- Capacidade de sequestro de espécies reactivas através da transferência de um átomo de hidrogénio (mecanismo HAT de hydrogen atom transfer).
- Actividade redutora (mecanismo SET de single electron transfer).
- Capacidade de quelação de metais, em especial o Fe^{2+} e o Cu^+ , evitando, deste modo, a formação de radicais hidroxilo através das reacções de Fenton.
- Indução das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase ou glutatíon peroxidase).
- Inibição da actividade de enzimas oxidativas como a xantina oxidase ou as ciclooxigenases, de cuja actividade resultam espécies reactivas de oxigénio.

Adicionalmente, os compostos fenólicos podem proteger da oxidação outros antioxidantes fisiologicamente importantes como, por exemplo, o α -tocoferol. Esta protecção pode resultar do facto dos polifenóis poderem ser preferencialmente oxidados ou conseguirem regenerar o radical antioxidante por doação de um átomo de hidrogénio (Robards *et al.*, 1999).

Dentro dos polifenóis, a hierarquia da atividade antioxidante é determinada pelas variações estruturais. Assim, a eficácia dos antioxidantes fenólicos, depende do número e da posição dos grupos hidroxilo ligados ao anel aromático, do tipo de substituintes e do seu local de ligação, da posição relativa dos grupos ligados e da sua habilidade para estabilizar e deslocalizar electrões desemparelhados no anel aromático. No caso concreto dos flavonóides, os arranjos estruturais que conferem maior atividade antioxidante são os seguintes (Rice-Evans *et al.*, 1997):

- Os grupos 3',4'-dihidroxi no anel B (p.e., catequina e quercetina).
- Os grupos 5,7-dihidroxi no anel A (p.e., caempferol).
- Para a deslocalização de electrões a presença da ligação dupla 2,3 em combinação com os grupos 4-ceto e 3-hidroxi no anel C (p.e., quercetina), desde que a estrutura o-dihidroxi no anel B esteja presente. No entanto, alterações no arranjo dos grupos

hidroxilo e substituição de grupos hidroxilo devido a glicosilação reduzem a atividade antioxidante.

- Para a quelação de metais, os pontos e ligação coordenada na molécula do flavonóide, são os grupos o-difenólicos nas posições 3'4'-dihidroxi no anel B e os grupos 4-ceto e 5-hidroxi no anel C. No entanto, a glicosilação de qualquer um destes pontos influencia na capacidade quelante dos flavonóides.

1.1.4. Efeitos dos polifenóis sobre a saúde humana

Há cada vez mais evidências que muitas doenças, como por exemplo, as doenças cardiovasculares, o cancro, as artrites, as disfunções cerebrais, problemas renais e as cataratas, podem estar relacionadas com os danos celulares causados por espécies reactivas de oxigénio (ROS). Desta forma, os antioxidantes da nossa dieta, em particular, os polifenóis, poderão ter um papel importante na prevenção destas doenças (Diaz *et al.*, 1997; Aruoma, 1998; Chatterjee *et al.*, 1999). A dar mais suporte a esta hipótese existem estudos epidemiológicos que indicam a existência de uma correlação inversa entre o consumo de frutas e legumes ricos em polifenóis e o aparecimento de doenças cardiovasculares e enfartes de miocárdio (Tomás-Barberán *et al.*, 2000), diversos tipos de cancro, cataratas, diabetes, doença de Alzheimer e mesmo a asma (Boyer & Liu, 2004).

Os organismos vivos encontram-se normalmente numa situação de equilíbrio entre o seu potencial pró-oxidante e antioxidante. Uma alteração desse equilíbrio em favor do potencial oxidante designa-se por *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo pode resultar de uma depleção de antioxidantes, devida a uma nutrição deficiente ou a uma produção em excesso de espécies reativas de oxigénio, tanto de origem endógena como exógena. As ROS incluem espécies químicas radiculares e não radiculares, derivadas do oxigénio, tais como, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical anião superóxido ($O_2^{2\bullet}$), o radical peróxido (HO_2^\bullet), o radical alcóxido (RO^\bullet) ou o radical hidroxilo (OH^\bullet).

Uma vez que estas espécies podem formar-se no decurso dos processos metabólicos normais, o Homem adquiriu defesas antioxidantes que incluem enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. No entanto, o sistema endógeno de defesa antioxidante é incompleto sem compostos exógenos redutores que desempenham um papel essencial em muitos mecanismos antioxidantes. Os principais antioxidantes de origem alimentar de frutos, vegetais e grãos são os seguintes (Bouayed & Bohn, 2010):

- Vitaminas: ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E);
- Elementos-traço: zinco e selénio;
- Carotenóides: β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina;
- Ácidos fenólicos: ácido clorogénico, ácido gálico, ácido cafeico, etc.
- Flavonóis: quercetina, caempferol, miricetina;

- Flavanóis: catequinas e epicatequinas;
- Antocianidinas: cianidina, malvidina e pelargonidina;
- Isoflavonas: genisteína e daidzeína;
- Flavanonas: naringenina, erioditiol e hesperitina;
- Flavonas: luteolina e apigenina;
- Outros compostos: glutatona, ácido úrico, compostos organossulfurados, ácido lipóico, albumina, bilirrubina e coenzima Q.

Todos os componentes celulares são suscetíveis de sofrer a ação das ROS (Figura 1.5). Assim, estas podem reagir com o DNA podendo levar à sua fragmentação ou à ocorrência de mutações que podem conduzir ao aparecimento de tumores (Bishop, 1991; Aruoma, 1998). As lesões no DNA podem levar ao aumento da actividade da enzima poli(ADP)ribose sintetase, o que leva a uma depleção do seu substrato o dinucleotídeo de adenina e nicotinamina (NAD) e, consequentemente do trifosfato de adenosina (ATP), podendo conduzir a disfunções e, eventualmente, à morte celular (Chatterjee *et al.*, 1999).

Quando reagem com as proteínas, as ROS podem causar alterações da estrutura terciária, degradação e fragmentação, o que pode traduzir-se por perda ou alteração da sua funcionalidade biológica. Desta forma, as ROS podem afectar o funcionamento de enzimas, transportadores e receptores celulares, podendo contribuir, de forma indirecta para o aparecimento de lesões noutras biomoléculas. Por exemplo, os danos nas enzimas de reparação ou de replicação do DNA podem levar a um aumento da frequência de mutações nesta molécula. As lesões nas proteínas podem levar a uma desregulação dos níveis de cálcio, com consequentes alterações no funcionamento celular, e dos níveis de ferro facilitando, neste caso, a ocorrência de reacções de Fenton de que resulta maior produção de ROS. Uma das consequências da desregulação do cálcio parece ser a activação de endonucleases que podem levar à fragmentação do DNA (Aruoma, 1998).

Quando reagem com os lípidos, as ROS podem desencadear o processo de reacções destrutivas em cadeia nos ácidos gordos poli-insaturados constituintes das membranas celulares (Robards *et al.*, 1999). A peroxidação lipídica ocorre em três fases. A primeira fase, iniciação, envolve o ataque de uma espécie reactiva de oxigénio a um grupo metileno presente nos lípidos, separando-o assim de um átomo de hidrogénio, originando um radical ácido gordo. Em células aeróbias, devido à elevada concentração de oxigénio, ocorre então, a reacção entre este e o radical ácido gordo formando o radical peroxilo. Segue-se então a fase de propagação, uma vez que o radical peroxilo formado é também capaz de separar átomos de hidrogénio dos ácidos gordos adjacentes, dando assim origem a um hidroperóxido e a outro radical ácido gordo levando, desta forma, à propagação da reacção. Deste modo, uma única iniciação pode resultar numa centena de conversão de ácidos gordos a hidroxiperóxidos lipídicos. A última fase da peroxidação, a terminação, ocorre quando o radical peroxilo reage com outro radical ou então com um antioxidante, que por ser capaz de parar

este processo é caracterizado como um antioxidante capaz de quebrar reacções em cadeia (Haliwell & Chirico, 1993).

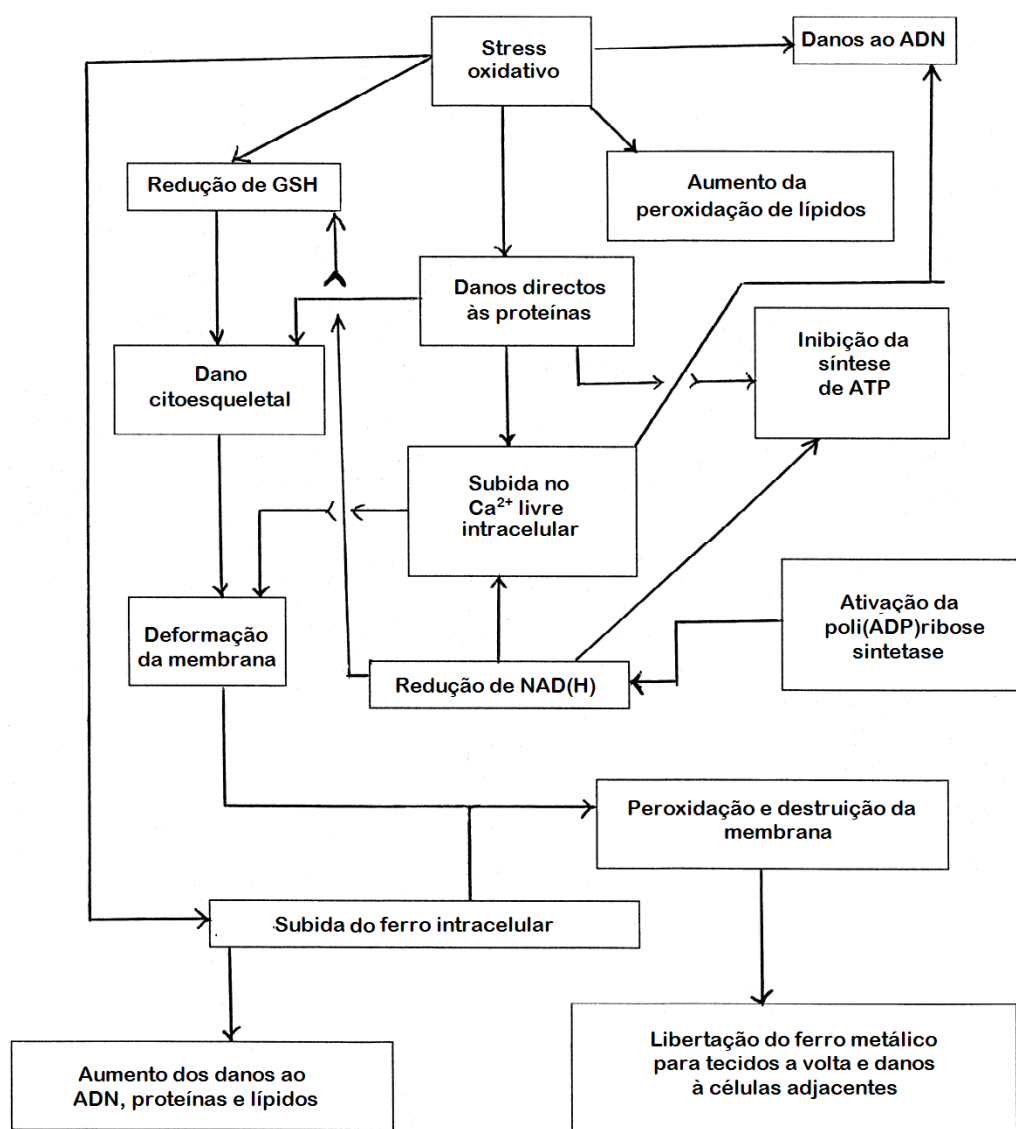


Figura 1.5: Mecanismos de lesão celular associados ao *stress* oxidativo (Aruoma, 1998).

Os danos que a peroxidação lipídica pode causar nas membranas biológicas podem conduzir à lise celular. Por outro lado, os hidroperóxidos resultantes destas reacções podem sofrer rearranjos e originar compostos capazes de reagir com diversas biomoléculas das células, incluindo o DNA, causando danos celulares. Para além da lipoperoxidação de ácidos gordos poli-insaturados, foi igualmente descrito que as ROS podem modificar as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, desta forma, contribuir para a patogénese da aterosclerose (Chung *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999). O *stress* oxidativo leva à depleção dos antioxidantes endógenos como, por exemplo, a forma reduzida da glutathiona (GSH). A depleção de GSH está relacionada com o aparecimento de lesões nas

proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas com a normal permeabilidade das membranas (Aruoma, 1998).

Os polifenóis presentes na dieta têm sido associados com a promoção da saúde através de efeitos que compreendem a diminuição dos níveis de açúcar no sangue, a redução o peso corporal, actividade antimutagénica/anticarcinogénica, antiestrogénica, anti-inflamatória, anti-envelhecimento, antitrombótica, antimicrobiana e, principalmente, actividade antioxidante (Ferguson, 2001; Scalbert *et al.*, 2005). Os polifenóis podem exercer as suas propriedades bioativas, quer pelas suas propriedades antioxidantes, quer por mecanismos adicionais como, por exemplo, através da afectação da sinalização intracelular e/ou da expressão genética, podendo modelar a actividade de receptores, enzimas e factores de transcrição (Williams *et al.*, 2004). Em relação à actividade antimutagénica/anticarcinogénica, diversos trabalhos têm demonstrado que os polifenóis a podem exercer através de diferentes mecanismos que incluem a inibição da absorção de mutagénicos, a desactivação de espécies potencialmente mutagénicas, a modulação da expressão dos genes das enzimas de reparação do DNA e a inibição da formação endógena de mutagénicos (Ferguson, 2001).

No entanto, altas doses de antioxidantes exógenos podem criar distúrbios no equilíbrio redox e exercer efeitos pró-oxidantes. Com efeito, ensaios epidemiológicos têm demonstrado que os efeitos benéficos dos fitoquímicos são observados predominantemente quando estes são consumidos na sua forma natural dentro da matriz dos alimentos e não tanto quando estes são administrados em doses elevadas, tais como as presentes em suplementos alimentares. Isto deve-se a dois factores principais que normalmente não são tidos em conta na elaboração dos suplementos: (1) as concentrações geralmente baixas em que os fitoquímicos surgem nos alimentos; (2) os efeitos aditivos e os sinergismos que ocorrem na mistura complexa de fitoquímicos e nutrientes que compõe os alimentos (Bouayed & Bohn, 2010).

1.3 Polifenóis na maçã

Os principais grupos de polifenóis encontrados nas maçãs são os seguintes (Tomás-Barberán *et al.*, 2000; Feliciano *et al.*, 2010):

- Flavonóis (entre os quais a quercetina e o caempferol);
- Flavanóis (entre os quais a (+)-catequina e a (-)-epicatequina);
- Ácidos hidroxicinâmicos e derivados (entre os quais o ácido clorogénico);
- Dihidrocalconas (entre as quais a floretina);
- Antocianidinas (entre as quais a cianidina).

Os polifenóis encontrados nas maçãs raramente se encontram na forma isolada, mas sim em formas glicosiladas, diméricas ou poliméricas, podendo apresentar formas isoméricas. A quercetina e o caempferol (Figura 1.6) encontram-se sempre nas formas glicosiladas e estas formas diferenciam-

se umas das outras pelo açúcar que a elas está ligado. As formas que foram descritas incluem: quercetina-glucosido, quercetina-rutinosido (rutina), quercetina-galactosido, quercetina-ramnosido, quercetina-xilosido, quercetina-arabinosido (Duda-Chodak *et al.*, 2010), caempferol-3-glucosido (Feliciano *et al.*, 2010) (Figura 1.7).

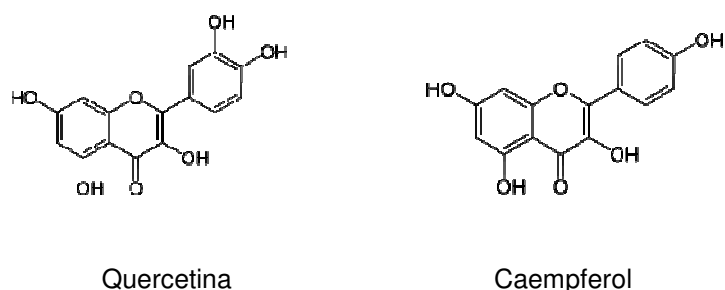


Figura 1.6: Estrutura química dos flavonóis quercetina e caempferol (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

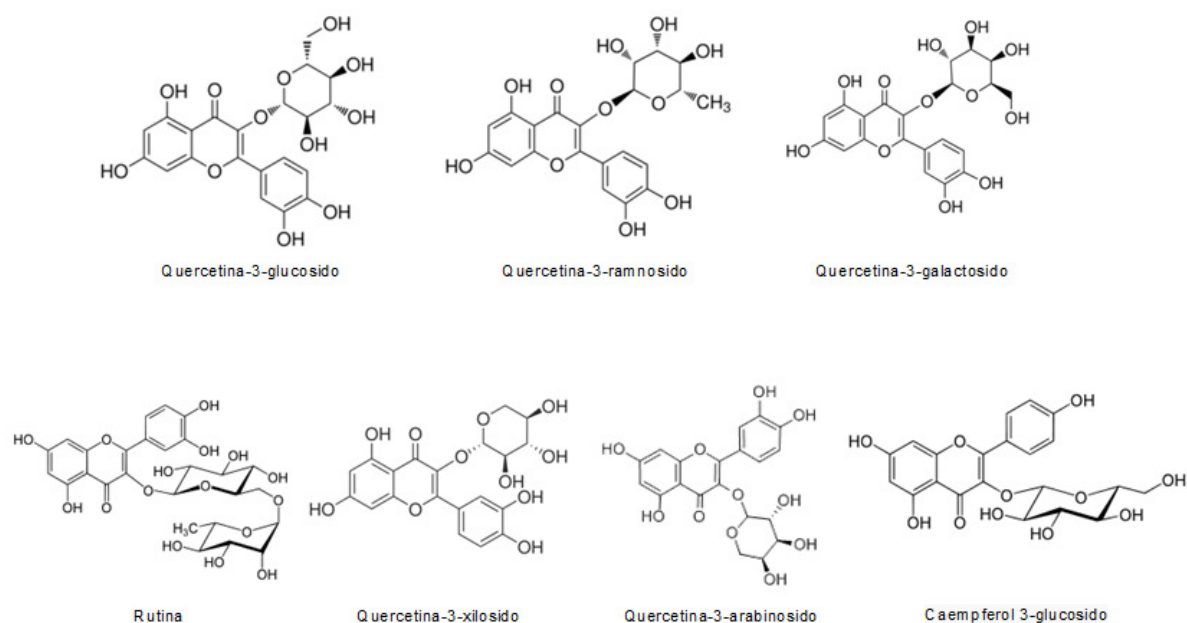


Figura 1.7: Estrutura química dos derivados glicosilados da quercetina e caempferol encontrados nas maçãs (Duda-Chodak, 2010; Feliciano *et al.*, 2010).

As formas monoméricas dos flavanóis são os enantiômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina, as formas diméricas reportadas incluem a procianidina B1, procianidina B2 (Figura 1.8) (Duda-Chodak *et al.*, 2010 & Feliciano *et al.*, 2010) e procianidina C (Duda-Chodak *et al.*, 2010), no entanto, a maior parte encontra-se polimerizada naquele que é o principal grupo de polifenóis, as

procianidinas. Tanto é assim que todos polifenóis monoméricos contam para apenas 20% da actividade antioxidante total do extrato de maçã (Lotito & Frei, 2004).

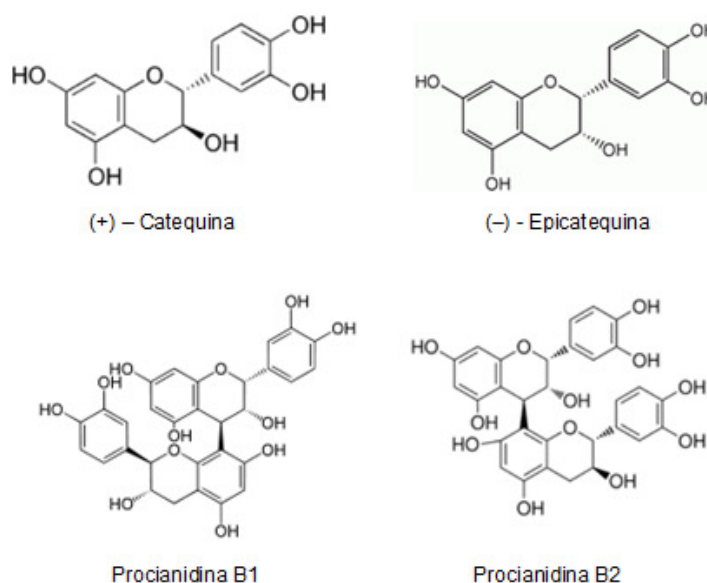


Figura 1.8: Estrutura química das procianidinas e dos seus precursores encontrados nas maçãs (Duda-Chodak *et al.*, 2010).

Entre os derivados dos ácidos fenólicos, o ácido clorogénico (ácido 5'-cafeolquínico) (Figura 1.9) é o principal constituinte embora os ácidos 4'-cafeolquínicos e 3'-cafeolquínicos também tenham sido reportados bem como derivados dicafeolquínicos. A maçã contém o ácido cafeico, p-cumárico e ferúlico (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). As dihidrocalconas encontram-se na maçã na forma da floretina e do seu glucósido floridzina (Figura 1.10) (Ceyman *et al.*, 2010). O principal pigmento antocianidínico na maçã é a cianidina 3-galactósido (Figura 1.11), embora também se tenham descrito a presença de cianidina 3-glucósido, 3-arabinósido e 3-xilósido bem como de derivados acilados (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

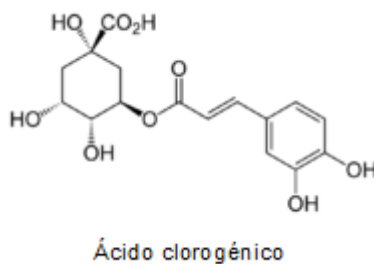


Figura 1.9: Estrutura química de um derivado do ácido hidroxicinâmico encontrado nas maçãs (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

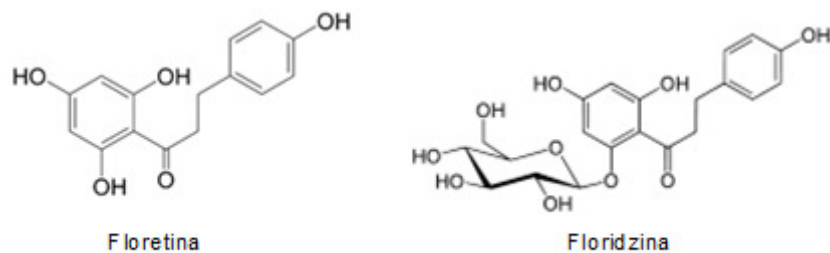


Figura 1.10: Estruturas químicas das dihidrocalconas encontradas nas maçãs (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

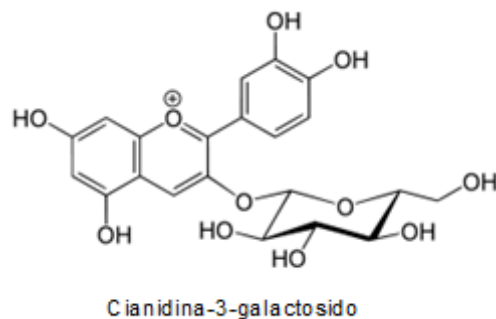


Figura 1.11: Estrutura química de um pigmento de antocianidina (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

A distribuição dos polifenóis varia consideravelmente entre as diferentes cultivares e também dentro dos diferentes tecidos da maçã (Tsao *et al.*, 2003; Alonso-Salces *et al.*, 2004). As variedades de sidra, geralmente, têm maior concentração de polifenóis que as maçãs de sobremesa (Sanoner *et al.*, 1999).

O conteúdo em compostos fenólicos das maçãs é regulado por fatores ambientais e de pós-colheita que incluem o clima, a fertilização, o estado de maturação, a exposição à luz, as condições de armazenamento e de processamento (Robards *et al.*, 1999; Awad *et al.*, 2000; Awad & De Jager, 2002; Kondo *et al.*, 2002; Boyer & Liu, 2004), havendo uma tendência para a redução da atividade antioxidante e do teor em fenóis totais com o progredir do amadurecimento (Kondo *et al.*, 2002). Adicionalmente Yuri e colaboradores (2009) verificaram uma variabilidade de fenóis totais em função da localização geográfica quer em termos de altitude quer em termos de latitude.

Estes factores parecem influenciar de forma diferenciada a síntese dos polifenóis. Assim, verificou-se que as maçãs mais expostas à luz solar apresentam níveis de cianidina-3-galactosido e de quercetina-3-glicosido maiores do que as maçãs que se encontram mais à sombra, não se

verificando o mesmo em relação aos teores de floridzina, catequina nem de ácido clorogénico (Awad *et al.*, 2000). Por outro lado, a fertilização em azoto parece estar associada à redução no teor em fenóis totais, reduzindo a concentração de antocianinas e catequinas, enquanto que a fertilização em cálcio parece ter um efeito contrário aumentando o teor em antocianinas e em fenóis totais (Awad & De Jager, 2002).

A distribuição dos polifenóis pela maçã não é uniforme. Assim, verifica-se, de um modo geral, que a concentração destes compostos na casca do fruto é cerca de 3 a 8 vezes superior à respectiva concentração na polpa, sendo o de flavonóides 2 a 6 vezes mais elevado (Wolfe *et al.*, 2003). Esta diferente distribuição dos polifenóis pode explicar o facto de, em vários genótipos de maçãs analisados, a atividade antioxidante da casca ser 3,6 a 10 vezes superior à da polpa (Wolfe *et al.*, 2003; Khanizadeh *et al.*, 2008). Esta maior atividade deve-se provavelmente à circunstância de haver antioxidantes poderosos, como os derivados da quercetina e as antocianinas, responsáveis pela cor vermelha da casca, que se encontram exclusivamente na casca (Escarpa e Gonzalez, 1998; Tsao *et al.*, 2003; Tsao *et al.*, 2005; Yuri *et al.*, 2009), além do facto da maioria dos fenóis comuns à casca e à polpa se encontrarem, ainda assim, em maior concentração na casca (Wolfe *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2010). Excepção a esta observação é o ácido clorogénico que se encontra em maior concentração no núcleo e sementes, apresenta um valor intermediário na polpa e baixo na casca. As catequinas encontram-se predominantemente na casca embora também se encontrem na polpa. A floridzina encontra-se predominantemente nas sementes seguido de valores intermediários no núcleo e casca e valores muito baixos na polpa (Awad *et al.*, 2000, Boyer & Liu, 2004, e Tsao *et al.*, 2003).

Os polifenóis existentes na maçã têm sido associados com as propriedades bioactivas dos extratos deste fruto. Assim, a catequina, epicatequina e procianidina B1 parecem ser polifenóis que mais contribuem para a atividade antioxidante das maçãs, enquanto que as procianidinas B1 e B2, a floridzina e a epicatequina parecem desempenhar um papel importante contra a proliferação de células humanas de carcinoma do cólon (HT29), carcinoma gástrico (MKN45) (Serra *et al.*, 2010) e células leucémicas (HL-60) (Yoshiawa *et al.*, 2005). A actividade antiproliferativa verificada em linhas celulares de hepatocarcinoma humano (HepG2) foi cerca de 7 vezes mais forte com extratos preparados a partir da casca da maçã do que com extratos preparados a partir da polpa (Wolfe *et al.*, 2003).

Edenharder (2003) estudou o efeito antimutagénico de alguns fenóis da maçã e concluiu que a catequina, epicatequina, rutina e quercetina apresentavam forte atividade antimutagénica em estirpes de *Salmonella thyphimurium*, além de também apresentarem forte actividade antioxidante. Pelo contrário, a floretina apresentou uma actividade antioxidante moderada e nenhum efeito antimutagénico.

A actividade antioxidante das maçãs tem sido estudada em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Assim, em ensaios *in vitro*, sumos preparados a partir de diferentes variedades de maçã revelaram a capacidade

de inibir a oxidação das LDL humanas, verificando-se uma correlação positiva entre esta capacidade e o teor polifenóis totais dos sumos analisados (Pearson *et al.*, 1999). Por outro lado, foi possível verificar uma maior inibição da peroxidação de lípidos e maior capacidade antioxidante do plasma de ratos alimentados com a casca da maçã quando comparados com ratos alimentados apenas com a polpa, o que foi relacionado com a maior concentração de polifenóis existente na casca destes frutos (Leontowicz *et al.*, 2003).

Em ensaios com ratos alimentados com maçãs verificou-se, igualmente que a presença deste fruto na alimentação levava uma redução do colesterol facto que também foi associado ao seu teor em polifenóis e em vitamina C (Aprikian *et al.*, 2001). Em vários ensaios de actividade antioxidante *in vitro*, os polifenóis da maçã têm revelado uma actividade antioxidante mais intensa do que a das vitaminas C e E (Lu & Foo, 2000).

Estudos epidemiológicos indicam que o risco de ocorrência de enfartes de miocárdio é cerca de 49% mais baixo em indivíduos que consomem 110 gramas ou mais de maçã por dia do que em indivíduos que consomem menos de 18 gramas por dia (Lu & Foo, 2000). Mais uma vez, este efeito tem sido associado ao teor em polifenóis da maçã. A dar mais força a esta associação existem estudos que mostram a existência de uma correlação inversa entre o consumo de flavonóis e flavonas e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de enfartes de miocárdio (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

1.4 Produção e qualidade do sumo de maçã

A produção de sumo de fruta envolve vários tratamentos como digestão enzimática, concentração, tratamento térmico, filtração, etc. O armazenamento a frio é geralmente utilizado para reduzir a respiração e metabolismo destes produtos e para aumentar o seu tempo de vida útil. Em alguns casos atmosferas controladas são usadas para inibir a degradação e manter os atributos de qualidade da fruta (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). As várias etapas de produção do sumo são apresentadas na figura 1.12.

Normalmente os sumos de fruta são processados a temperaturas acima dos 80°C para eliminar microrganismos de degradação e inactivar enzimas oxidativas como a polifenol oxidase (PPO) (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000).

No que diz respeito à estabilidade microbiológica dos sumos, verifica-se que as condições mínimas de processamento de produtos com elevada acidez são de cerca de 70°C por 6 segundos. Para muitos sumos este tratamento assegura uma redução de 5 logaritmos decimais da carga de *Escherichia coli* O157:H7, resistente a meios ácidos, mas não inativa microrganismos e enzimas responsáveis pela deterioração, razão pela qual os sumos tratados nestas condições devem ser distribuídos e armazenados em condições de refrigeração. Este inconveniente leva a que os sumos

de fruta sejam normalmente tratados a temperaturas entre os 90 e os 100 °C para aumentar o seu tempo de vida útil (Kato *et al.*, 2003). No entanto, um estudo de Noci e colaboradores (2008) mostrou que foi possível chegar a uma estabilidade microbiológica num período de 6 meses com 6 logaritmos decimais de redução da flora microbiana com apenas 72 °C de temperatura de pasteurização.

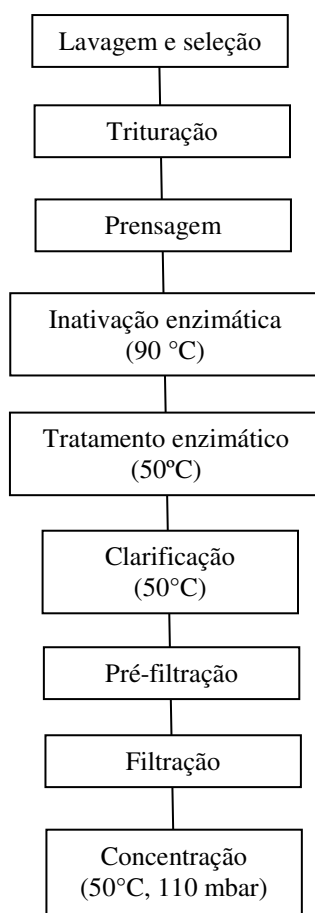


Figura 1.12: Diagrama de produção de concentrado de maçã (Burdurlu & Karadeniz, 2003).

A inativação da PPO constitui um passo muito importante na produção do sumo de maçã, sendo geralmente efectuado por processamento térmico (a PPO é inactivada a temperaturas acima dos 80°C), refrigeração, diminuição do pH, adição de agentes anti-escurecimento e/ou inibidores da enzima (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000; Tomás-Barberán & Espín, 2001). Embora alguns autores tenham reportado a inactivação direta da PPO através da adição de ácido ascórbico ou derivados, o principal papel deste composto no controlo do escurecimento é de reduzir os radicais fenoxil e as formas quinónicas dos fenóis para os respectivos precursores fenólicos numa reacção redox acoplada (Chow *et al.*, 2011). No entanto, o efeito do ácido ascórbico é temporário, uma vez que este se oxida a ácido desidroascórbico, seja nas condições enzimáticas ou de oxidação química, podendo o escurecimento voltar a ocorrer depois do seu esgotamento (Serpen & Gökmen, 2007). No caso da maçã, a inactivação enzimática requer um aquecimento a 90 °C por 30 segundos. Além disso, a

prensagem em presença de inibidores da PPO como o ácido ascórbico ou dióxido de enxofre aumentam drasticamente os rendimentos de polifenóis (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

1.4.1. Consequência do processamento sobre as propriedades do sumo

Operações como o esmagamento, tratamentos enzimáticos e prensagem levam à activação da PPO e à consequente degradação dos compostos fenólicos, resultando na perda de atividade antioxidante. O maior grau de oxidação ocorre na polpa antes e durante a prensagem. A oxidação pode prolongar-se depois da extração se se demorar a proceder à inactivação da PPO. As enzimas pectolíticas usadas na clarificação podem causar hidrólise de ácidos hidroxicinâmicos na maçã. Além disso, o uso da gelatina como agente de clarificação reduz os fenóis totais, com os fenóis poliméricos a serem os mais afectados (Tomás-Barberán *et al.*, 2000). As antocianidinas destroem-se a temperaturas superiores a 60°C e a destruição é tanto maior quanto menor o pH e maior a concentração de oxigénio (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000; Patras *et al.*, 2010).

Devido a todas estas perdas durante a extracção do sumo, verifica-se que o sumo de maçã obtido por prensagem tem apenas 10% da atividade oxidante da maçã e se previamente à prensagem se tiver realizado um tratamento enzimático esta atividade é de apenas 3%. Depois do tratamento enzimático o sumo apresenta 33% menos floridzina, 44% menos ácido clorogénico, 58% menos de catequina e 43 a 59% menos antocianinas (Boyer & Liu, 2004; Patras *et al.*, 2010).

Também durante o armazenamento do sumo de maçã ou de concentrados de sumo se verifica a degradação de fenóis. Após armazenamento por 9 meses a 25°C, os concentrados de sumo mostraram uma perda de 36 % de ácidos hidroxicinâmicos, 60% de glucósidos de quercetina e fletetina e uma perda total de procianidinas (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

Os aromas dos sumos de fruta são muito propensos a degradarem-se durante o processamento térmico. No entanto, até uma temperatura de 90°C o grau de aceitação do consumidor é idêntico ao sumo não pasteurizado, embora haja uma tendência na redução da classificação até aos 100°C de pasteurização (Kato *et al.*, 2003). Estes efeitos contrastantes explicam a classificação semelhante entre o sumo pasteurizado e não pasteurizado já que há consumidores que favorecem mais os aromas doces e frescos e outros que favorecem o aroma verde por estar mais associado a um produto natural. As alterações no aroma do sumo são dependentes tanto da temperatura como do tempo de tratamento. No entanto, prolongando-se o tempo de pasteurização ocorrem mais pontos ótimos de qualidade o que se justifica pela formação devida ao calor de compostos de aroma voláteis (Su & Wiley, 1998).

1.4.2. Escurecimento enzimático

O escurecimento enzimático é um fenómeno que ocorre em frutas e vegetais e cuja principal responsável é a enzima polifenol oxidase (PPO). Esta enzima catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e a oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas altamente reativas que polimerizam originando a formação de pigmentos heterogéneos pretos, castanhos e vermelhos (Tomás-Barberán & Espín, 2001). O processamento da maçã resulta na alteração físico-química das membranas das células do fruto, causando a descompartimentação subcelular, levando ao contacto da enzima com o oxigénio e daí à sua activação e ao aparecimento do escurecimento enzimático (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000). Este escurecimento é afectado por factores como a distribuição e actividade da PPO, a concentração em fenóis totais e a concentração de oxigénio, havendo variedades de maçã em que o escurecimento enzimático está diretamente relacionado com a atividade da enzima e outras em que está diretamente relacionado com o teor em fenóis (Ye *et al.*, 2007).

1.4.2.1. Polifenol oxidase – caracterização bioquímica

A PPO é uma enzima contendo cobre presente nas plantas superiores que causa modificações indesejadas de cor e sabor nos sumos de fruta (Tomás-Barberán & Espín, 2001). Podem encontrar-se três sub-tipos da PPO (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000):

- Monofenol monooxygenase, fenolase, cresolase ou tirosinase – EC 1.14.18.1;
- *o*-difenol oxidoreductase, catecoloxidase ou difenoloxidase – EC 1.10.3.1;
- Lacase ou *p*-difenoloxidase – EC. 1.10.3.2.

A maioria das PPO's envolvidas no escurecimento enzimático são catecoloxidases (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000). A creselase catalisa a hidroxilação dos monofenóis a *o*-difenois que são posteriormente convertidos em quinonas pela catecoloxidase, catalisando a lacase a passagem os *p*-difenois a quinonas (Figura 1.13). As quinonas que se formam como resultado da oxidação primária dos fenóis têm diferentes cores, consoante o composto que lhes deu origem e consoante o pH. Esta primeira reacção pode ser revertida por reacção das quinonas com antioxidantes, como o ácido ascórbico ou o anidrido sulfuroso. Assim, estes compostos conseguem bloquear as reacções de escurecimento enzimático no seu passo inicial, conduzindo à regeneração do fenol original, mas apenas enquanto eles não se esgotam. Depois do seu esgotamento ocorre então a formação das *o*-quinonas e o escurecimento enzimático pode prosseguir (Robards *et al.*, 1999).

As polifenoloxidases contêm o cobre no seu centro activo e para que haja actividade enzimática é necessário que este esteja reduzido a Cu⁺, estado no qual a enzima consegue ligar-se ao oxigénio. Os polifenóis ligam-se apenas ao grupo oxi-PPO (Martinez & Whitaker, 1995). As quinonas resultantes da actividade das polifenoloxidases podem reagir com outro composto fenólico

originando dímeros ou regenerando o composto inicial, sendo que o dímero pode ser novamente oxidado, enzimaticamente ou via reacção com uma quinona, originando o aparecimento de oligómeros de cor escura (Figura 1.14) (Robards *et al.*, 1999). As quinonas podem, igualmente reagir com proteínas contribuindo, deste modo, igualmente para as reacções de escurecimento (Robards *et al.*, 1999). O papel protector do ácido ascórbico nas reacções de escurecimento enzimático dos fenóis encontra-se esquematizado na figura 1.15.

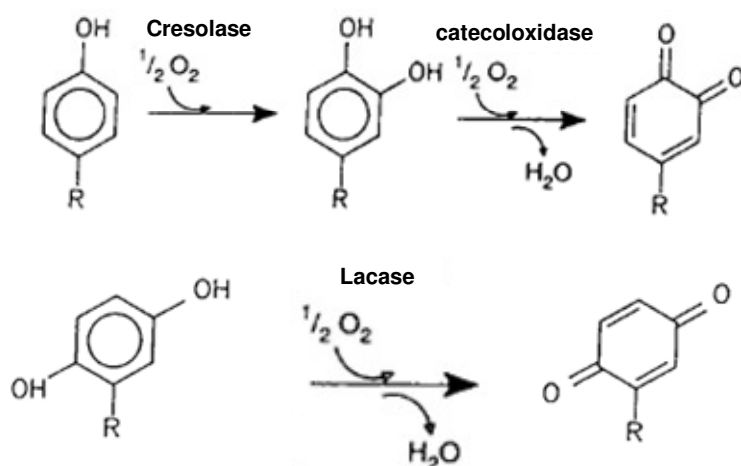


Figura 1.13: Reações catalisadas pelas polifenoloxidasas cresolase (E.C.1.14.18.1), catecoloxidase (E.C.1.10.3.1) e lacase (E.C.1.10.3.2) (Robards *et al.*, 1999).

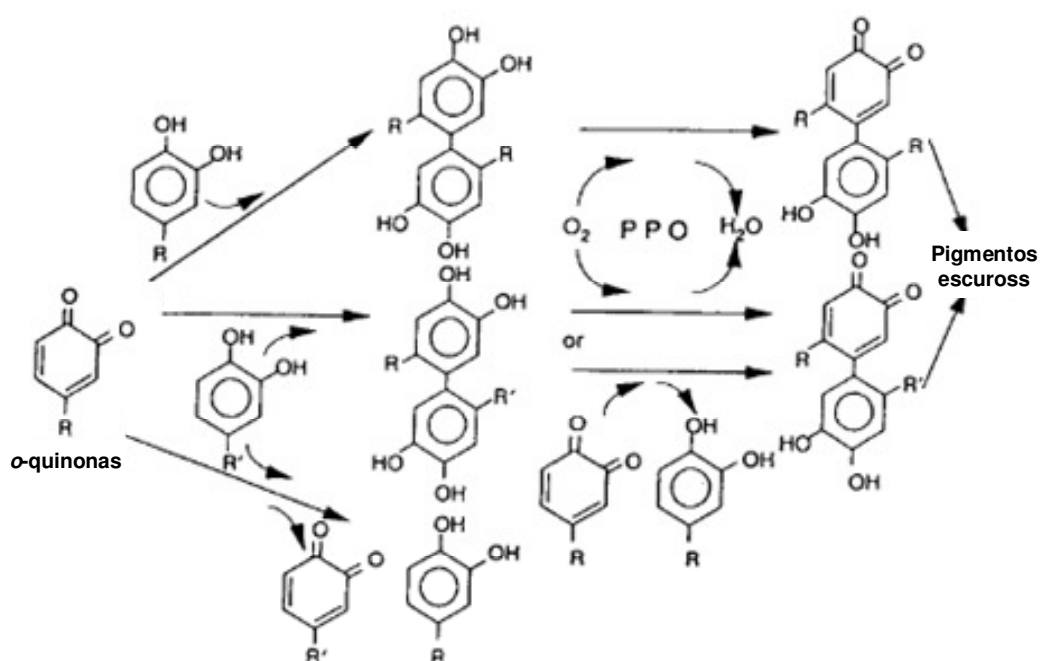


Figura 1.14: Formação de pigmentos escuros por oxidação dos polifenóis (Robards *et al.*, 1999).

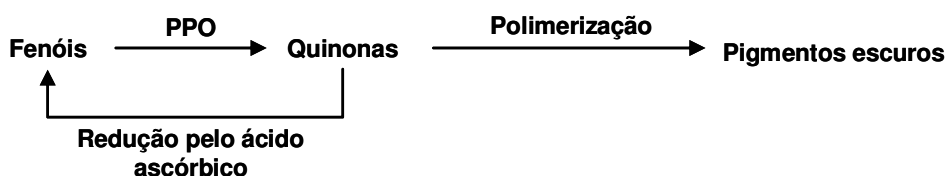


Figura 1.15: Formação de pigmentos escuros por oxidação dos polifenóis (Robards *et al.*, 1999).

A contribuição de um determinado substrato para o escurecimento enzimático depende da sua concentração e da natureza dos outros substratos presentes (Rocha *et al.*, 2000). Existe uma forte correlação entre os polifenóis totais e o grau de escurecimento enzimático, sendo maior para proantocianidinas, catequina, epicatequina e floridzina ($>0,8$) e baixo para o ácido clorogénico ($<0,6$) (Ye *et al.*, 2007). Este resultado foi, no entanto, contrariado por outros autores que encontraram uma forte correlação entre a concentração de ácido clorogénico e o escurecimento enzimático, o que pode ter sido devido ao facto das maçãs analisadas serem de diferentes variedades e, por isso, terem variações nas concentrações das PPO's e no pH que podem ter influenciado a atividade enzimática (Zemel *et al.*, 1990; Ye *et al.*, 2007). Também é de notar que, o facto de o ácido clorogénico se encontrar em grandes quantidades torna o seu papel importante no grau de escurecimento enzimático (Rocha *et al.*, 2000). Os flavonóis como a quercetina aparentam ser menos susceptíveis à ação enzimática (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

A PPO encontra-se em todas partes da maçã havendo variedades em que se encontra mais concentrada na casca e outras no córtex. A nível celular a PPO encontra-se nos cloroplastos em particular na face interna dos tilacóides, mas também se encontra nas mitocôndrias. Durante o amadurecimento ocorre uma mudança da enzima ligada para a forma solúvel, mas a atividade da enzima solúvel é sempre menor que a observada em frutos verdes (cerca de 17 % no caso da maçã) (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000).

A actividade desta enzima pode ser afectada pela presença de inibidores, pelo pH ou pela temperatura. Inibidores com eficiência superior a 80% são as soluções neutras e acidificadas de cloreto de sódio, cloreto de cálcio e a combinação de cloreto de sódio e cálcio, bem como o ascorbato de cálcio usado na prevenção do escurecimento enzimático de fruta cortada (Luo *et al.*, 2011).

O pH ótimo para a enzima PPO varia de 4,6 a 7,5 (Rocha *et al.*, 2000; Alonso-Salces *et al.*, 2004). Ainda assim, esta enzima é bastante tolerante a meios muito ácidos, sendo que só a um pH inferior a 2,5 existe uma quebra drástica de atividade para os 10 % (Zhou *et al.*, 1993). Esta variabilidade da atividade da PPO em função do pH deve-se ao facto do centro ativo da PPO conter resíduos de histidina que a valores de pH inferiores a 6,0 começam a ter carga positiva na sua cadeia lateral (grupo imidazol). Assim, a pH baixos a atividade enzimática é restringida, mas num intervalo de 3,5 - 6,5 a atividade da PPO aumenta com o aumento do pH (Zemel *et al.*, 1990).

No que toca à resistência térmica, esta é também variável não só entre espécies de fruta mas também entre variedades da mesma fruta. Existem estudos de resistência térmica que são feitos com a enzima isolada e outros que são feitos com o fruto inteiro o que resulta em resultados díspares. Zhou e colaboradores (1993) estudaram a estabilidade térmica da PPO isolada da maçã Monroe e verificaram que a temperatura ideal é de 30 °C para a reação com o catecol e a resistência térmica pode ir até aos 40 °C, temperatura a partir da qual começa a verificar um decréscimo da actividade da enzima observando-se uma inativação de 94 % aos 70 °C.

1.4.2.2. Impacto do escurecimento enzimático sobre a qualidade do sumo

O escurecimento enzimático dos tecidos danificados da fruta e vegetais é uma das principais causas de perda de qualidade da fruta e derivados (Komthong *et al.*, 2006). Este escurecimento tem um efeito negativo não só na cor, mas também nas outras propriedades sensoriais incluindo odor e textura (Martinez & Whitaker, 1995). Além disso, o escurecimento enzimático causa perdas nutricionais e promove a deterioração dos frutos (Awad *et al.*, 2000). A nível nutricional, a PPO está envolvida na degradação oxidativa do ácido ascórbico e dos polifenóis sendo esta tanto maior quanto maior for a susceptibilidade do polifenol à ação enzimática (Tomás-Barberán & Espín, 2001).

Os polifenóis na maçã estão muito associados ao *flavor* e à cor do sumo de maçã e da cidra, influenciando a amargura e a adstringência (Alonso-Salces *et al.*, 2004), pelo que a composição em polifenóis na maçã é importante no desenvolvimento destes produtos. No caso das maçãs as procianidinas são as principais responsáveis por conferir adstringência (Tomás-Barberán & Espín 2001). Segundo Komthong e colaboradores (2006), a intensidade do odor a verde reduz-se depois de duas horas de escurecimento. Por outro lado, os odores doces aumentam drasticamente na primeira hora de escurecimento. As intensidades do aroma fresco, odor a maçã e odor frutado aumentam também intensamente depois do sumo escurecer. O aroma a amargo não apresenta alterações significativas. O aroma não natural decresce nos primeiros 15 minutos de escurecimento passando a crescer depois. Segundo os mesmos autores, estas alterações no aroma resultaram no melhoramento das qualidades sensoriais principalmente pelo facto de o odor a doce ser o mais importante na avaliação dos consumidores. Desta forma, os autores concluíram que nas primeiras duas horas de escurecimento houve melhoria no odor do sumo de maçã, tendo, no entanto, para tempos de escurecimento superiores, o odor piorou devido à formação de compostos indesejados.

1.4.3. Escurecimento não enzimático

Mesmo depois de inativada a PPO, durante o tratamento térmico, a concentração e o armazenamento do sumo de maçã ocorrem reações de escurecimento não enzimático. Estas reações

compreendem essencialmente as reações de caramelização e as reações de Maillard. Adicionalmente, o escurecimento também pode dever-se à degradação de pigmentos (Burdulu & Karadeniz, 2003; Zhu *et al.*, 2009).

A caramelização ocorre quando os açúcares são aquecidos a temperaturas elevadas. Nestas condições, os açúcares sofrem desidratação e condensação, ocorrendo a formação de estruturas complexas de massas moleculares diferentes. A reação Maillard ocorre entre os grupos amino dos aminoácidos e os açúcares redutores, sendo a causa mais importante de escurecimento não enzimático no sumo de maçã (Burdulu & Karadeniz, 2003). Da condensação entre o grupo amina e os açúcares redutores resulta uma glicosilamina N-substituída, que sofre vários rearranjos até originar, em condições de pH ácido, como é o caso dos sumos de maçã, o aparecimento do furfural (quando estão envolvidas pentoses) ou hidroximetilfurfural (HMF) (quando estão envolvidas hexoses). Estes compostos, por sua vez, podem sofrer reações ciclização, desidratação, isomerização, rearranjo e condensação que podem originar o aparecimento de polímeros nitrogenados castanhos, conhecidos como melanoidinas (Figura 1.16) (Martins *et al.*, 2001).

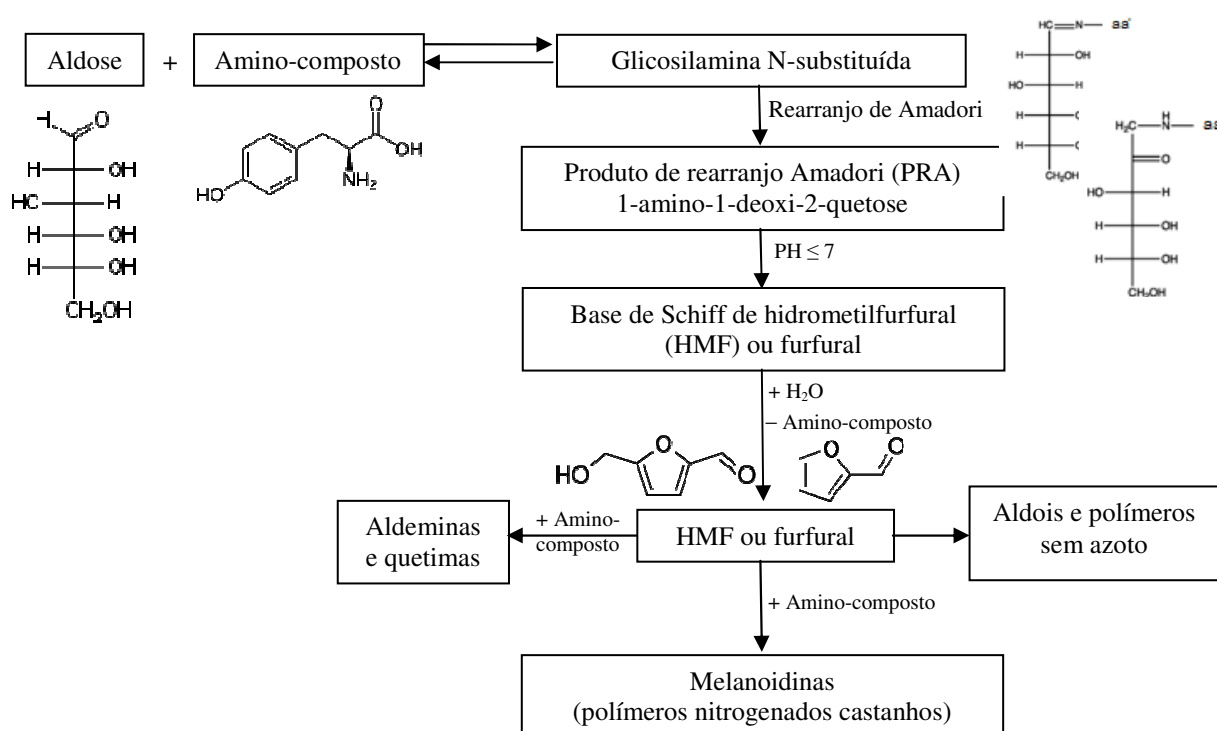


Figura 1.16: Esquema da reacção de Maillard (Martins *et al.*, 2001).

Durante o armazenamento de sumos e concentrados de maçã pode ocorrer o escurecimento não enzimático. Este escurecimento ocorre tanto mais depressa quanto mais elevada for a temperatura de armazenamento, uma vez que a velocidade da reação é tanto maior quanto maior for a temperatura. Mesmo quando os sumos e concentrados são armazenados em refrigeração, este

escurecimento pode ocorrer, embora num ritmo menos acelerado (Burdulu & Karadeniz, 2003). O escurecimento não enzimático pode levar a alguma perda de qualidade, por dar ao produto final uma aparência desfavorável, ou mesmo a uma redução na segurança do alimento, devido à formação de compostos potencialmente nocivos (Cohen *et al.*, 1998). A existência de uma correlação positiva entre o escurecimento enzimático e a concentração de hidroximetilfurfural (HMF) levou a que a reação de Maillard fosse considerada a causa predominante deste processo (Burdulu & Karadeniz, 2003).

A velocidade das reações de Maillard varia em função da variedade de maçã porque, embora a reação ocorra apenas entre o grupo amina dos aminoácidos e os açúcares redutores, a matriz envolvente também tem influência. Assim, verificou-se que a maçã *Golden* tem uma velocidade de reação muito superior à da maçã *Amasya*. Esta diferença de sensibilidade em relação ao escurecimento não enzimático parece resultar da maçã *Amasy* apresentar uma maior proporção de cetoses (frutose) enquanto que a maçã *Golden* apresenta uma maior proporção de aldoses (glucose). É sabido que a reação de Maillard ocorre em maior extensão na presença de aldoses do que de cetoses, da mesma forma que ocorre em maior extensão na presença de aminoácidos básicos do que na presença de aminoácidos ácidos (Burdulu & Karadeniz, 2003).

1.5 Métodos alternativos de produção de sumo de maçã

O método convencional de produção de sumos de fruta, que passa sempre por tratamentos térmicos, tem consequências significativas sobre a qualidade sensorial e nutricional e sobre as propriedades funcionais do produto final. Com efeito, o método térmico comumente aplicado a produtos alimentares líquidos apresenta algumas desvantagens como a ocorrência de mudanças bioquímicas e nutricionais (mudanças de cor, redução de sabor e aroma e perdas de nutrientes e de vitaminas) que alteram a qualidade do produto final e tornam-no menos atrativo para o consumidor (Choi & Nielsen, 2005). A crescente procura de alimentos de alta qualidade e com menor grau de processamento tem motivado o desenvolvimento de vários métodos de processamento alternativos como, por exemplo, a utilização de radiação ionizante, luz pulsada, pulsos eléctricos, pasteurização com fluidos supercríticos, radiação ultravioleta e de pressão elevada (Ortega-Rivas *et al.*, 1998). O interesse nestas novas tecnologias tem também como objetivo preservar compostos que possam proteger a saúde (compostos bioativos). A nível dos sumos, os tratamentos por pulsos eléctricos e por altas pressões têm sido alvo de investigação intensiva, embora haja também muitas publicações sobre a combinação de diversas destas tecnologias.

Tanto o tratamento do sumo por altas pressões como por pulsos eléctricos resulta numa menor perda de voláteis associados ao aroma do sumo de maçã resultando, portanto, numa maior manutenção das propriedades organolépticas (Aguilar-Rosas *et al.*, 2007). No entanto, para ambas as tecnologias, mesmo quando combinadas com a radiação ultravioleta não se consegue uma inativação eficiente da PPO (inativações sempre inferiores a 50%), o que faz com que os teores em

polifenóis e a atividade antioxidante dos sumos tratados por estas tecnologias não apresentem melhorias significativas nas suas propriedades funcionais.

Em relação ao tratamento dos sumos por pressões elevadas, embora se tenham conseguido resultados promissores no que toca à eliminação de microrganismos, a inativação enzimática que se consegue é ainda insuficiente para evitar o escurecimento enzimático (Buckow *et al.*, 2009). Mais ainda como os inibidores enzimáticos têm apenas uma ação temporária (Chow *et al.*, 2011) a sua adição apenas retarda o escurecimento mas não resolve o problema, o que faz com que sumos de maçã produzidos com recurso a hiperpressões sejam particularmente escuros.

O tratamento por altas pressões tem o inconveniente de, através da disrupção da membrana celular do fruto, levar à ativação da PPO ligada à membrana, aumentando até 5 vezes a sua atividade (Tomás-Barberán & Espín, 2001). De facto, a inativação enzimática por altas pressões tem uma eficácia reduzida visto que para se reduzir a actividade da PPO em 90% é necessário aplicar pressões 800 MPa por 30 minutos (Weemaes *et al.*, 1998). Estes valores estão no limite máximo utilizável a nível industrial (900 MP) e o tempo necessário é completamente insustentável para a produção em massa. De facto, na produção industrial de sumos por hiperpressão a pressão é mantida por menos de um minuto.

Suárez-Jacobo e colaboradores (2011) fizeram a comparação entre sumos tratados por tratamento térmico e por altas pressões e compararam com o sumo sem qualquer tipo de tratamento. Esta comparação evidenciou que a nível do perfil fenólico se obtiveram melhores resultados para o sumo pasteurizado seguido do sumo sujeito a altas pressões e por fim no sumo não tratado. Estes resultados foram explicados com base no grau de inativação da PPO que foi total, no caso do sumo pasteurizado, parcial, no caso do sumo tratado por altas pressões e inexistente, no caso do sumo não processado. Esta observação reforça a ideia de que a PPO é uma das principais responsáveis pelas perdas de propriedades funcionais durante a produção e conservação dos sumos de fruta.

O tratamento dos sumos por pulsos eléctricos está relacionado com a instabilidade electromecânica das membranas celulares que resulta na formação irreversível de poros (electroporação). Este tipo de tratamento tem-se mostrado igualmente ineficiente na inativação da PPO, mesmo combinando a técnica com a aplicação de radiação ultravioleta. Em termos sensoriais o sumo tratado por pulsos eléctricos não parece distanciar-se do sumo tratado por pasteurização, embora no caso do sumo tratado por pulsos eléctricos a perda de voláteis tenha sido muito inferior (Caminiti *et al.*, 2011). Segundo Schilling e colaboradores (2007) e Noci e colaboradores (2008), o tratamento por pulsos eléctricos não parece ter uma influência significativa no perfil nutricional e de polifenóis dos sumos de maçã.

Outras tecnologias incluem a aplicação de micro-ondas e de ultra-sons, sendo que a primeira passa por elevar a temperatura até 80° C conseguindo-se assim inactivar a PPO e a segunda só

consegue alguma inactivação quando combinada com o aquecimento (Tomás-Barberán & Espín, 2001). Deste modo, nenhuma destas tecnologias resolve o problema da perda de voláteis.

Uma abordagem que tem sido tentada para melhorar o carácter funcional do sumo consiste no aproveitamento do prensado de maçã para enriquecer em compostos bioativos o sumo produzido de forma convencional. Lu & Foo (1997) quantificaram a existência de 7g de polifenóis por kg de prensado seco, dos quais mais de metade correspondiam a glicósidos de quercetina. Ao fazer-se uma extração do prensado com uma mistura equimolar de álcool e água e adicionando este extrato ao sumo conseguiu-se aumentar em cerca de cinco vezes a atividade antioxidante destes em relação ao sumo convencional, aumentando o seu teor em quercetina em mais de nove vezes (Van der Sluis *et al.*, 2004).

Outra forma de melhorar o perfil bioativo é a aplicação de água quente (acima de 57 °C) previamente à prensagem. Este procedimento permite, por um lado, aumentar rendimento do sumo e, por outro lado, aumentar o rendimento de extração dos polifenóis pouco solúveis em água. Assim, os sumos obtidos desta forma apresentam níveis de quercetina (concentrada na casca) e floridzina (concentrada nas sementes) muito mais elevados pelo facto de estes compostos terem baixa solubilidade em água fria. Conseguem-se assim rendimentos 5 vezes superiores em termos de fenóis totais e 12 vezes superiores no caso das procianidinas (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

2. Material e Métodos

2.1 Amostra

Para a produção do sumo de maçã foram adquiridas comercialmente maçãs da variedade *Golden Delicious*, produzidas em Portugal, com um calibre 50/60, tendo todas as modalidades de sumo não pasteurizado e todas as modalidades de sumo pasteurizado sido efectuadas com maçãs provenientes do mesmo lote.

2.2 Reagentes e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetona (Panreac, 99,9%); acetonitrilo (Merck, Lichrosolv); ácido cítrico monohidratado (JMGS, 99,8%); ácido clorogénico (Sigma, ≥98%,HPLC); ácido fosfórico (Panreac, 85%); ácido gálico monohidratado (Merck, 99,5%); ácido L(+)-ascórbico (Panreac, 99%); ácido tiobarbitúrico (TBA) (Acros, 98%); ácido tricloroacético (Riedel-de Haën, 99,5%); bacto triptona (Becton Dickinson and Company); carbonato de sódio anidro puro (JMGS); catecol (Sigma, 99%); cloreto de sódio (Panreac, 99,5%); epicatequina (Sigma, ≥90%,HPLC); etanol absoluto (Riedel-de Haën, 99,8%); hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (Merck, 99,5 %); 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Aldrich); meio de cultura “plate count agar” (Becton Dickinson and Company); meio de cultura de lactose, sais biliares e verde brilhante (Biokar Diagnostics); meio de cultura de rosa de bengala e cloranfenicol (Biokar Diagnostics); quercetina 3-β-D-glucosido (Sigma, ≥90%,HPLC); reagente de Folin-Ciocalteu (Merck). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura, utilizou-se água ultrapura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.3 Preparação do sumo de maçã

A preparação do sumo da maçã foi efectuada recorrendo a quatro diferentes métodos (Figura 2.1). Antes da preparação do sumo as maçãs foram sempre lavadas com água, secas e pesadas. Todos os procedimentos de extração foram efetuados em triplicado.

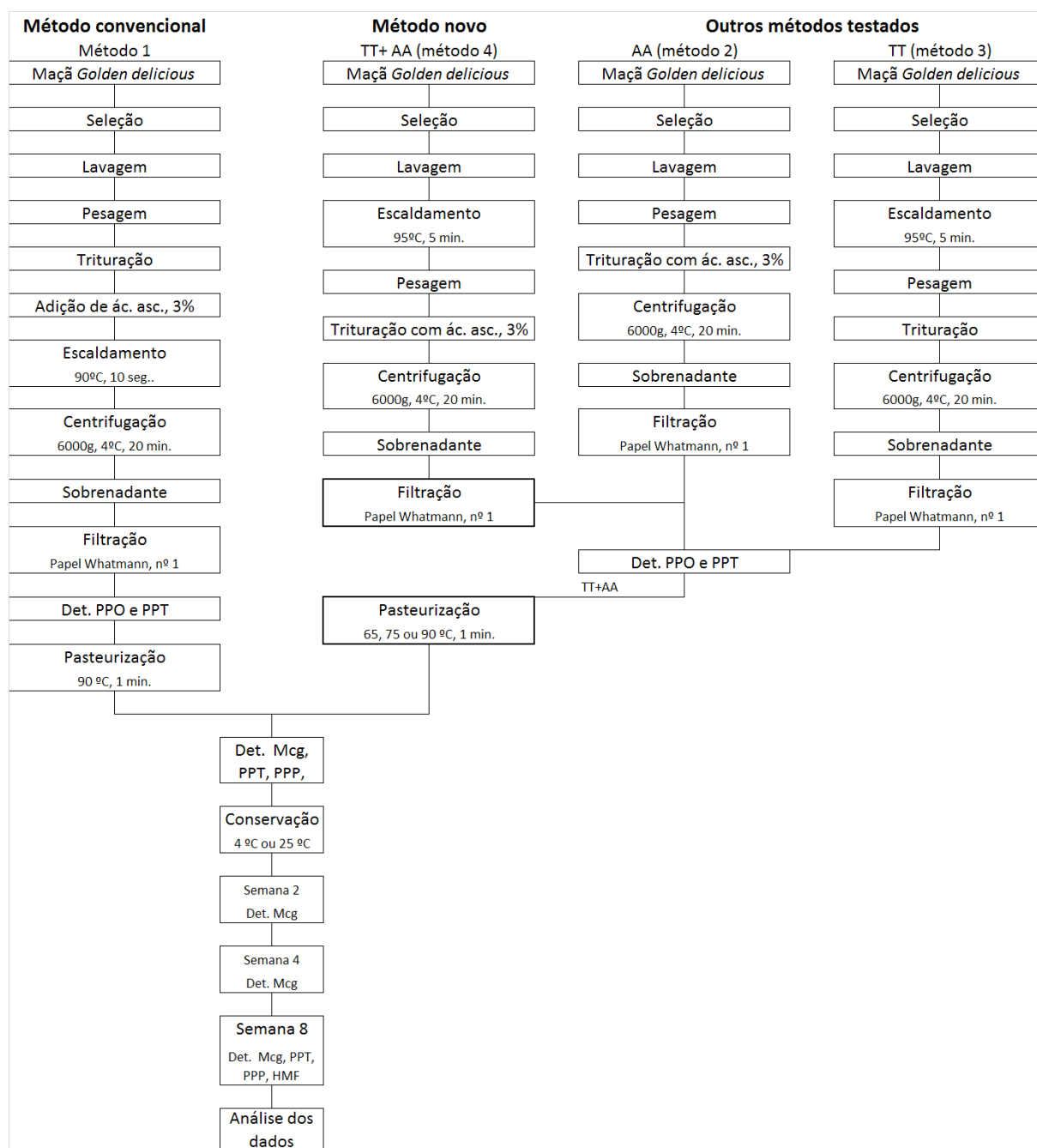


Figura 2.1: Fluxograma de extração e análise do sumo de maçã.

2.3.1. Método 1 (método convencional)

As maçãs foram descaroçadas, cortadas e trituradas num copo liquidificador (Electric Co), juntamente com 0,35 mL de água miliQ por grama de amostra, durante um minuto. Foi necessária adição de água para que o liquidificador conseguisse triturar devidamente a maçã. De seguida,

adicionou-se 0,05 mL de ácido ascórbico a 3% por grama de amostra. A quantidade de ácido ascórbico adicionada foi a necessária para que visualmente se deixasse de detectar o escurecimento. A mistura foi então aquecida em banho-maria a uma temperatura de 90 °C durante 10 segundos de modo a inativar a PPO, tendo, em seguida, sido centrifugada a 6 000 *g* e a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga Sigma 4K-15C). O sobrenadante foi recolhido em gelo e filtrado por um filtro de papel (Whatman nº 1). Retirou-se uma amostra para análise imediata da actividade da PPO, tendo o restante sumo sido alíquotado e congelado a -20°C para posterior determinação do teor em polifenóis totais.

2.3.2. Método 2

As maçãs foram descaroçadas, cortadas e trituradas num copo liquidificador (Electric Co), juntamente com 0,35 mL de água miliQ por grama de amostra e 0,05 mL de ácido ascórbico a 3% por grama de amostra, durante um minuto. A mistura foi então centrifugada a 6 000 *g* e a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga Sigma 4K-15C). O sobrenadante foi recolhido em gelo e filtrado por um filtro de papel (Whatman nº 1). Retirou-se uma amostra para análise imediata da actividade da PPO, tendo o restante sumo sido alíquotado e congelado a -20°C para posterior determinação do teor em polifenóis totais.

2.3.3. Método 3

As maçãs foram escaldadas durante 5 minutos num banho de água a 90 °C. Após esta operação, as maçãs foram descaroçadas, cortadas e trituradas num copo liquidificador (Electric Co), juntamente com 0,35 mL de água miliQ a 90 °C por grama de amostra, durante um minuto. A mistura foi então centrifugada a 6 000 *g* e a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga Sigma 4K-15C). O sobrenadante foi recolhido em gelo, filtrado por um filtro de papel (Whatman nº 1). Retirou-se uma amostra para análise imediata da actividade da PPO, tendo o restante sumo sido alíquotado e congelado a -20°C para posterior determinação do teor em polifenóis totais.

2.3.4. Método 4

As maçãs foram escaldadas durante 5 minutos num banho de água a 90 °C. Após esta operação, as maçãs foram descaroçadas, cortadas e trituradas num copo liquidificador (Electric Co), juntamente com 0,35 mL de água miliQ a 90° C por grama de amostra e 0,05 mL de ácido ascórbico a 3 % por grama de amostra, durante um minuto. A mistura foi então centrifugada a 6 000 *g* e a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga Sigma 4K-15C). O sobrenadante foi recolhido em gelo e filtrado por um filtro de papel (Whatman nº 1). Retirou-se uma amostra para análise imediata da actividade da

PPO, tendo o restante sumo sido alíquotado e congelado a -20°C para posterior determinação do teor em polifenóis totais.

2.3.5. Maçã sem tratamento

Para servir de controlo nas determinações realizadas foi efectuado um sumo sem nenhum tipo de tratamento de inactivação. Assim, neste caso, as maçãs foram descaroçadas, cortadas e trituradas num copo liquidificador (Electric Co), juntamente com 0,35 mL de água miliQ por grama de amostra, durante um minuto, tendo a mistura sido centrifugada a 6 000 g, a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga Sigma 4K-15C). O sobrenadante foi recolhido em gelo e filtrado por um filtro de papel (Whatman nº 1). Retirou-se uma amostra para análise imediata da actividade da PPO, tendo o restante sumo sido alíquotado e congelado a -20°C para posterior determinação do teor em polifenóis totais.

2.4.Otimização da temperatura de pasteurização

Os métodos de preparação atrás descritos foram avaliados em termos de capacidade de inactivação da PPO e teor em polifenóis no sumo, tendo o método 4 sido aquele que apresentou os resultados mais satisfatórios nestes dois ensaios. Desta forma, o sumo preparado por este método foi sujeito a diferentes temperaturas de pasteurização, tendo a eficiência e o impacte na qualidade do sumo destas pasteurizações sido determinada. Para comparação efectuou-se o sumo pelo método convencional (método 1).

Nesta fase, procedeu-se novamente à preparação dos sumos de acordo com os procedimentos anteriormente descritos (pontos 2.3.1 e 2.3.4), com a alteração de após a centrifugação o sobrenadante ter sido sujeito a um tratamento térmico. Assim, o sumo preparado pelo método 1 foi sujeito a uma pasteurização a 90 °C durante 1 minuto, considerando-se este o tratamento térmico convencional, enquanto que o sumo obtido pelo método 4 foi dividido em três partes iguais tendo cada uma delas sido sujeita a um tratamento térmico diferente: 90 °C durante 1 minuto, 75 °C (temperatura de pasteurização alta) durante 1 minuto e 65 °C (temperatura de pasteurização baixa) igualmente durante 1 minuto. A pasteurização foi efectuada em banho de água tendo o sumo sido distribuído em volumes de 10 mL por diferentes tubos de ensaio de modo a que o aquecimento fosse rápido. Todos os procedimentos de pasteurização foram efectuados em triplicado. O sumo pasteurizado foi assepticamente distribuído por frascos estéreis e conservado durante dois meses ao abrigo da luz e a duas temperaturas diferentes: temperatura ambiente e 4 °C.

No dia da preparação dos sumos e ao longo do seu tempo de armazenamento os sumos foram sendo avaliados em relação a diferentes parâmetros químicos e microbiológicos:

- Assim no dia da preparação dos sumos, antes destes serem pasteurizados, recolheram-se alíquotas que foram conservadas a -20 °C para posterior análise do teor em polifenóis totais e determinação do perfil fenólico.
- Ainda no dia da preparação dos sumos foram recolhidas amostras depois das diferentes pasteurizações e, após arrefecimento, efectuou-se a análise microbiológica. Em seguida recolheram-se alíquotas que foram conservadas a -20 °C para posterior análise do teor em polifenóis totais, determinação do perfil fenólico e determinação do escurecimento não enzimático.
- Após duas semanas, um mês e dois meses de conservação, procedeu-se à análise microbiológica dos sumos armazenados à temperatura ambiente e a 4 °C.
- No fim dos dois meses de conservação, os sumos armazenados à temperatura ambiente e a 4 °C foram ainda analisados em termos de polifenóis totais, perfil fenólico e escurecimento não enzimático.

2.5. Rendimento da extração

Para a determinação do rendimento da produção de sumo calculou-se a percentagem de volume de sumo em relação à massa total de maçãs utilizadas na sua produção.

2.6. Determinação da atividade da polifenol oxidase (PPO)

Entre terem sido colhidas e analisadas as amostras estiveram sempre no gelo e ao abrigo da luz. A PPO foi determinada segundo o método descrito por Özoglu & Bayindirli (2002). Assim, numa cuvete de espectrofotómetro adicionaram-se 500 µL de amostra e 3 mL de uma solução de catecol (0,2 M) em tampão McIlvane a pH 6,5 (142 mL de Na₂HPO₄ 0,2 M e 58 mL de ácido cítrico 0,1 M). A cuvete foi colocada no espectrofotómetro (SPEKOL 1500, Analytik Jena) tendo a absorvância a 420 nm sido registada de segundo a segundo durante 3 minutos. A actividade enzimática nos diferentes sumos foi determinada com base no declive da curva de absorvância em função do tempo, sabendo que uma unidade de enzima causa, nestas condições experimentais, uma variação na absorvância a 420 nm de 0,001 por minuto.

2.7. Determinação dos polifenóis totais

Para a determinação dos fenóis totais utilizou-se o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, usando uma adaptação da metodologia descrita por Kosar *et al.* (2008).

Assim, em balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca 6 mL de água MiliQ, adicionou-se o volume adequado das amostras de sumo e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição.

Deixou-se um minuto à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e fez-se o volume a 10 mL com água MiliQ. As amostras foram então incubadas durante 2 horas, a 25°C e no escuro. Terminado este tempo foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul. Procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500, Analytik Jena) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 0,5 e os 5 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de sumo.

2.8. Determinação do perfil fenólico

Foram quantificados os polifenóis ácido clorogénico, epicatequina e quercetina 3-β-D-glucosido. Estes polifenóis foram escolhidos pelas seguintes razões:

- A quercetina é um polifenol que se apresenta sempre na forma glicosilada e exclusivamente na casca da maçã (Escarpa & Gonzalez, 1998; Tsao *et al.*, 2003; Tsao *et al.*, 2005; Yuri *et al.*, 2009) e foi analisada para avaliar a eficiência do método de extração do sumo na remoção dos polifenóis da casca do fruto.
- A epicatequina é altamente susceptível à ação da PPO (Ye *et al.*, 2007) pelo que foi escolhida para avaliar a eficiência do método de extração na proteção dos polifenóis contra a degradação enzimática.
- O ácido clorogénico foi escolhido com o objetivo de avaliar a degradação dos polifenóis por via não enzimática já que este polifenol é menos susceptível à ação da PPO na maçã *Golden Delicious* (Ye *et al.*, 2007).

O perfil fenólico dos sumos foi efectuado por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), com recurso a um cromatógrafo (Waters, 440) equipado com um detector de ultravioleta-visível, utilizando o *software* Karat (versão 7.0, Beckman Coulter, Inc). A separação foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Bravo e colaboradores (2006). Assim, os sumos foram filtrados (membranas Millipore Millex GP de 0.22 µm), tendo a separação sido efectuada a 35°C, utilizando uma coluna Lichrosorb 100 RP-18 (Merck) (5 µm, 250 mm x 4 mm), com um fluxo de 700 µL/minuto, utilizando uma fase móvel composta por uma mistura de eluente A (ácido fosfórico 0,1%) e eluente B (ácido fosfórico-acetonitrilo-água-1:400:599, v/v/v) de acordo com o seguinte gradiente: 0-15 minutos de 0% a 20 % eluente B; 15-25 minutos 20 % eluente B; 25-70 minutos de 20% a 70% de eluente B; 70-75 minutos 70% eluente B; 75-85 minutos de 70% a 100% de eluente B, 85-90 minutos 100% de eluente B. A detecção foi efectuada a 280 nm, tendo os tempos de retenção do ácido clorogénico, epicatequina e quercetina 3-β-D-glucosido sido de 39,87, 45,31 e 61,48 minutos,

respectivamente. A quantificação foi efectuada por interpolação de rectas de calibração obtidas por injeção de soluções padrão de cada um dos polifenóis pesquisados.

2.9. Determinação do escurecimento não enzimático - determinação de HMF

O hidroximetilfurfural (HMF) é um produto intermediário formado no decurso das reacções de escurecimento não enzimático que podem ocorrer durante o processamento e armazenamento dos sumos de maçã. Deste modo, este composto pode ser utilizado como indicador da presença deste tipo de reacções, mesmo antes de se detectar uma alteração visível na cor (Cohen *et al.*, 1998).

Para a determinação do HMF seguiu-se a metodologia descrita por Cohen e colaboradores (1998). Assim, as amostras foram extraídas com etanol absoluto numa proporção de 1:1 e centrifugadas durante 10 minutos a 6000 *g*, tendo-se recolhido o sobrenadante. Seguidamente, tomou-se 1 mL deste sobrenadante para um tubo de ensaio juntou-se 1 mL de ácido tricloroacético (12% p/v) e 1 mL de TBA (0,2 M). Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 50 min e imediatamente arrefecidos em água fria à temperatura ambiente. Procedeu-se então à leitura das absorvâncias (espectrofotómetro SPEKOL 1500, Analytik Jena) a 443 nm contra um branco de cor, preparado exactamente da mesma forma mas substituindo o TBA por água destilada. A concentração em HMF, expressa em mg/L de sumo, foi determinado por interpolação de uma recta de calibração preparada com soluções de HMF com concentrações entre os 0 e os 30 mg/L, após estas terem sofrido um procedimento experimental igual ao aplicado às amostras.

2.10. Análise microbiológica

A estabilidade microbiológica dos sumos foi avaliada através da determinação dos microrganismos totais a 30°C , bolores e leveduras a 25°C e pesquisa de *Escherichia coli*.

2.10.1. Contagem de microrganismos totais a 30°C

A contagem de microrganismos totais a 30°C foi efectuada de acordo com a norma ISO4833:2003. Assim, foi efectuada uma sementeira por incorporação de 1 mL do sumo ou das suas diluições decimais (preparadas em triptona 0,1%, NaCl 0,85%) em meio de cultura *Plate Count Agar*. As placas foram incubadas em estufa a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 72 horas, em aerobiose.

2.10.2. Contagem de bolores e leveduras a 25°C

A contagem de bolores e leveduras a 25 °C foi efectuada de acordo com a norma ISO21527-1:2008. Assim, foi efectuada uma sementeira em superfície do sumo ou das suas diluições decimais (preparadas em triptona 0,1%, NaCl 0,85%) em meio de cultura de rosa de bengala e cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa a 25 ± 1 °C, durante 120 horas, em aerobiose.

2.10.3. Pesquisa de *Escherichia coli*

A pesquisa de *E. coli* foi efectuada de acordo com a NP-2308 (1986). Assim, esta pesquisa foi efectuada por inoculação em meio de cultura de lactose, sais biliares e verde brilhante, contendo tubo de Durham invertido para verificação da produção de gás, seguida de incubação em estufa a 44 ± 1 °C, durante 48 horas.

2.11. Análise Estatística

Aplicou-se o teste t para comparação das médias (considerando um intervalo de confiança de 95%) recorrendo à utilização do *software* Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Escolha do melhor método de preparação do sumo

Na primeira fase do trabalho testaram-se quatro métodos diferentes de preparação do sumo de maçã: o método 1 em que se procedeu à trituração das maçãs, seguida de adição de ácido ascórbico e posterior escaldamento da papa; o método 2 em que se procedeu à trituração em presença do ácido ascórbico; o método 3 em que se efectuou um escaldamento das maçãs antes da sua trituração e o método 4 em que se combinou o escaldamento das maçãs com a presença de ácido ascórbico durante a trituração. Tentou-se, então, averiguar qual destes quatro métodos conduzia a uma menor perda dos compostos fenólicos da maçã o que está estreitamente relacionado com a inativação da PPO. Para servir de controlo foi efectuado um sumo sem nenhum tipo de tratamento térmico e ao qual não se adicionou ácido ascórbico.

3.1.1. Verificação da actividade da PPO

Os resultados do ensaio de determinação da actividade da PPO encontram-se na figura 3.1. Nos sumos preparados pelo método 1 (convencional) e pelo método 4 (combinação de escaldamento com ácido ascórbico) não se verificou nenhuma variação na absorvância durante todo o tempo do ensaio (180 segundos). No método 3 (maçã triturada após escaldamento mas sem adição de ácido ascórbico), verificou-se uma diminuição na velocidade de variação da absorvância com o tempo em relação ao sumo controlo, enquanto que no método 2 (maçã triturada com ácido ascórbico mas sem tratamento térmico), se verificou que o escurecimento enzimático só começou a ocorrer após cerca de 1 minuto de contacto com o catecol, ao contrário do sumo não tratado que teve um escurecimento imediato após a mistura. No entanto, assim que se iniciou o escurecimento este apresentou uma velocidade igual à do controlo.

A partir deste ensaio foi possível determinar a actividade da enzima PPO (U/mL) nos diversos sumos preparados (Figura 3.2). Assim nos sumos preparados pelos métodos 1 e 4 não se detectou actividade enzimática, ou seja, verificou-se uma inibição total da PPO, no sumo preparado pelo método 2 a actividade da PPO não foi significativamente diferente da actividade do sumo controlo, enquanto que no sumo preparado de acordo com o método 3 a actividade enzimática foi inibida em cerca de 64% em relação ao controlo.

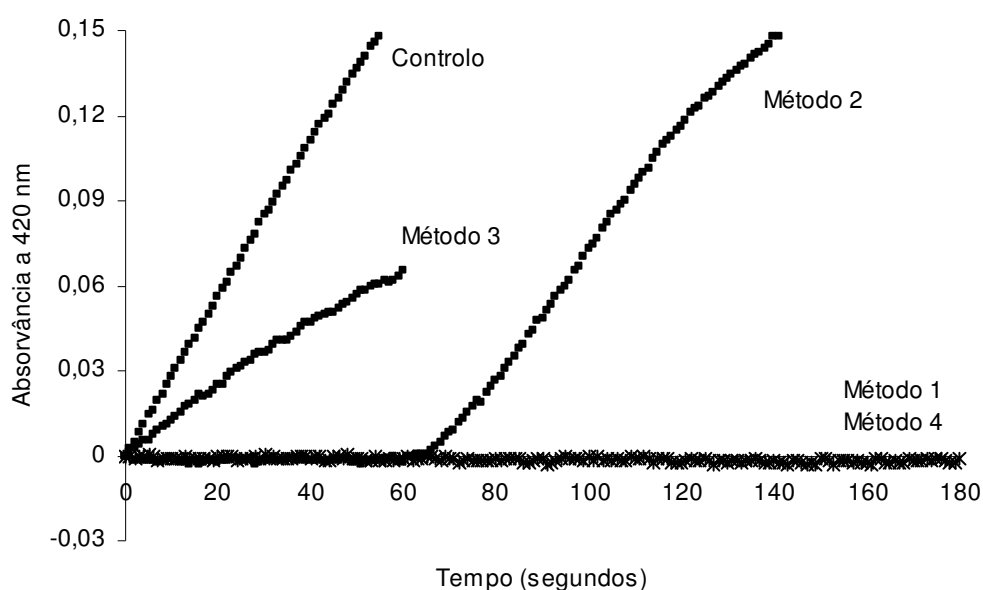


Figura 3.1: Curvas de variação da absorvância a 420 nm com o tempo obtidas no ensaio da actividade da PPO no sumo controlo (sem nenhum tipo de tratamento) e nos sumos obtidos pelos quatro métodos experimentais utilizados.

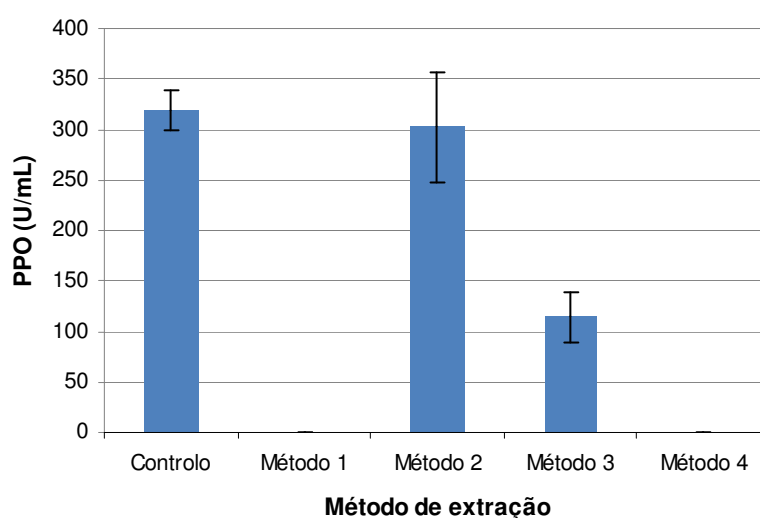


Figura 3.2: Actividade da enzima polifenol oxidase (U/mL) no sumo controlo (sem nenhum tipo de tratamento) e nos sumos obtidos pelos quatro métodos experimentais utilizados.

A inactivação enzimática é muito importante, não só por motivos sensoriais, mas principalmente porque a actividade da PPO está associada à degradação nutricional dos sumos, quer em termos de diminuição do teor em polifenóis, quer em termos de diminuição do ácido ascórbico (Ye *et al.*, 2007). A inactivação completa da PPO no sumo preparado pelo método 1 deve ter sido devida

à desnaturação enzimática que, no caso da PPO, ocorre a partir de temperaturas superiores a 80°C (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000). No caso do método 2 verificou-se que a adição de ácido ascórbico não teve um efeito significativo sobre a actividade da enzima. Este fato é suportado pela literatura que indica que embora este ácido seja um excelente inibidor do escurecimento enzimático, a sua acção é reversível, uma vez consiste em reduzir os polifenóis oxidados pela PPO. Assim, quando o ácido ascórbico se esgota, o escurecimento enzimático é retomado. Isto explica o fato de na análise da atividade enzimática, o sumo preparado pelo método 2 ter levado muito mais tempo a escurecer, após a adição da solução de catecol, que o sumo controlo ou o sumo preparado pelo método 3 (sem adição de ácido ascórbico). O escaldamento da maçã a 90°C antes da sua trituração resultou numa inativação de 64% da actividade da enzima. Embora a temperatura utilizada seja suficiente para inativação da PPO a temperatura do núcleo da maçã deverá ter ficado abaixo dos 80°C, pelo que a inativação não foi total. Ainda assim conseguiu-se um bom resultado, possivelmente devido ao fato da maior parte da PPO se encontrar na casca (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000). Quando se combinou o escaldamento com a adição de ácido ascórbico na trituração, a inativação da PPO foi total isto porque, embora este ácido tenha uma ação reversível, a enzima remanescente está tão pouco activa que o ácido ascórbico consegue inibir a sua acção a longo prazo.

Assim dos quatro métodos estudados apenas o método 1 (convencional) e o método em que se combinou o tratamento térmico com a trituração em presença do ácido ascórbico (método 4) resultaram numa inativação eficiente da enzima polifenol oxidase.

3.1.2. Teor em polifenóis nos sumos preparados pelos diferentes métodos

O teor em compostos fenólicos totais foi avaliado através da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, tendo os resultados mostrado a existência de diferenças significativas entre todas as amostras (Figura 3.3).

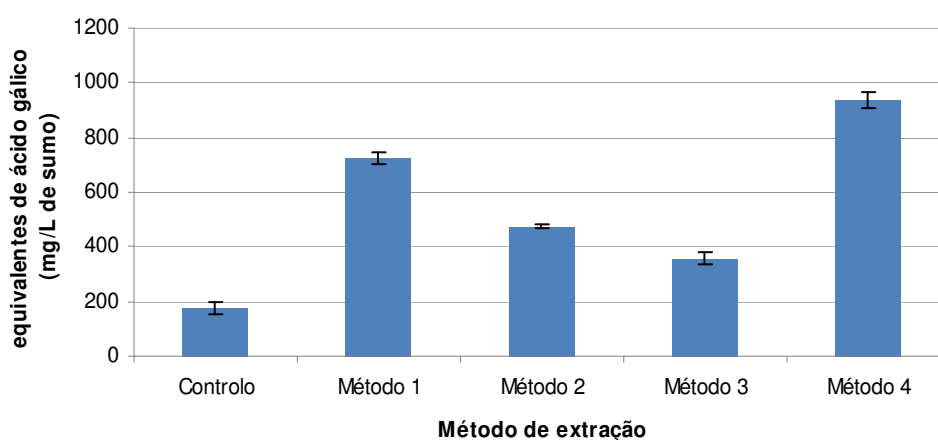


Figura 3.3: Concentração dos compostos fenólicos totais no sumo controlo (sem nenhum tipo de tratamento) e nos sumos obtidos pelos quatro métodos experimentais utilizados.

A comparação do teor em polifenóis não pode ser efectuada de forma igual entre todas as amostras uma vez que a algumas delas (métodos 1, 2 e 4) se adicionou ácido ascórbico. Com efeito, uma vez que este ácido também reduz o reagente de Folin-Ciocalteu (Prior *et al.*, 2005), a sua adição interfere com os resultados do ensaio originando um incremento no teor em polifenóis. Esta interferência pode explicar, em parte, os valores mais elevados que se obtiveram nos três métodos em que se adicionou ácido ascórbico. Deste modo, a comparação entre os valores de polifenóis dos sumos irá ser feita entre os grupos sem ácido ascórbico adicionado (sumos controlo e método 3) e com ácido ascórbico adicionado (métodos 1, 2 e 4). O sumo obtido pelo método 3 (maçã previamente escaldada), apresentou um teor em polifenóis totais que foi aproximadamente o dobro do valor obtido no sumo controlo. Este resultado deverá derivar, por um lado, da menor actividade da PPO no sumo obtido pelo método 3, e, portanto, numa maior protecção dos compostos fenólicos neste sumo, e, por outro lado, do facto de no método 3 a extração se ter realizado a quente o que poderá ter contribuído para uma maior solubilização dos polifenóis das partículas de maçã que, de outra forma, remanesceriam no resíduo de filtração.

Em relação aos sumos obtidos pelos métodos 1, 2 e 4, verificou-se que os métodos que combinam aquecimento com adição de ácido ascórbico resultam em sumos com teores em polifenóis mais elevados. Mais uma vez a explicação pode residir na maior protecção dos fenóis do sumo devido à inactivação da PPO e ao aquecimento durante a preparação. O sumo obtido pelo método 4 foi o que apresentou melhores resultados, mostrando que esta técnica parece ser mais eficiente que o convencional em relação à extração dos polifenóis da maçã. A diferença verificada entre o método 1 e o 4 poderá resultar da inibição da PPO no método 4 ser mais rápida (imediatamente na altura da trituração e não apenas numa fase subsequente). O sumo obtido pelo método 4 era muito menos pastoso do que o sumo obtido pelo método 1. Esta diferença pode ser uma vantagem em termos tecnológicos na manipulação do sumo. De facto, o escaldamento que se efetua ao triturado no método 1 torna-o numa massa muito pastosa, sendo mais difícil separar o sumo da polpa, ao contrário do método 4 em que o pré-escaldamento da maçã leva à libertação do sumo sem a gelificação da mistura. Estes resultados vão de encontro aos resultados do estudo de Maceiras e colaboradores (2007) sobre as diferentes viscosidades de purés de fruta frescos e cozidos.

No seu todo, estes resultados evidenciam, por um lado, que a polifenol oxidase é a principal responsável pela degradação de polifenóis, realçando a importância desta enzima estar inibida na altura da trituração, e, por outro lado, evidenciam que o tratamento térmico, nas condições em que foi efectuado, contribui para aumentar o rendimento da extração de polifenóis para o sumo.

Combinando os resultados de inactivação enzimática com o teor em polifenóis logo após a trituração verifica-se que o método 4 é aquele que apresenta os resultados mais satisfatórios. Assim, este foi o método escolhido para prosseguir com os ensaios de pasteurização mantendo sempre a comparação com o método 1, por este ser considerado o método convencional.

3.2. Otimização da temperatura de pasteurização

O sumo preparado pelo método 4 foi pasteurizado a diferentes temperaturas: 90°C (temperatura convencional), 75°C (temperatura de pasteurização média) e 65°C (temperatura de pasteurização baixa), tendo sido testada a eficiência e o impacto na qualidade do sumo de cada uma das pasteurizações realizadas. Foi efectuada sempre a comparação com o sumo convencional (sumo preparado pelo método 1 e pasteurizado a 90°C). Deste modo, foram preparadas quantidades maiores destes sumos tendo-se determinado os respectivos rendimentos de extração. A eficiência da pasteurização foi avaliada através da determinação da estabilidade microbiológica dos sumos, imediatamente após a sua pasteurização e ao longo de dois meses de conservação a 4 e a 25 °C. O impacto na qualidade foi avaliado através do teor em compostos fenólicos totais, do perfil fenólico e do escurecimento não enzimático.

3.2.1. Rendimento de extração

Em relação aos rendimentos de extração não se verificaram diferenças significativas entre o método convencional, com um rendimento de $(62,3 \pm 4,1)\%$, e método 4, com um rendimento de $(61,9 \pm 5,1)\%$. Deste modo, as maiores dificuldades em separar o sumo da polpa no método convencional, devido a como já foi anteriormente referido, a consistência deste ser bastante mais pastosa, não afectaram o rendimento de extração.

3.2.2. Estabilidade microbiológica dos sumos ao longo da conservação

Todos os sumos se apresentaram estáveis do ponto de vista microbiológico. Assim, em todas as datas em que foram analisados (imediatamente após a pasteurização e ao fim de 15, 30 e 60 dias de conservação a 4 e a 25°C) nunca se detectou a presença de *E. coli* e as contagens de microrganismos totais a 30°C e de bolores e leveduras a 25°C foram sempre nulas.

Segundo Kato e colaboradores (2003) só a partir dos 90°C se consegue a eliminação de todos microrganismos e enzimas envolvidos na deterioração dos sumos de fruta. O fato de mesmo a 65°C se ter conseguido uma boa estabilidade pode prender-se com o fato de a maçã ter sido previamente tratada a 90°C, eliminando os microrganismos que na prática se encontram predominantemente na casca do fruto. Os resultados obtidos indicam, assim, que nas condições de extração utilizadas a temperatura de pasteurização mais baixa pode ser suficiente para garantir a estabilidade microbiológica do sumo durante um período de dois meses, mesmo quando este é armazenado à temperatura ambiente.

3.2.3. Teor em polifenóis nos sumos após pasteurização

O teor em polifenóis das várias amostras foi analisado imediatamente após a pasteurização e ao fim de dois meses de conservação a 4 e a 25°C. Os resultados obtidos permitiram verificar que durante a conservação, se observaram alterações no teor em polifenóis dos sumos. Assim, ao longo da conservação, quer a 4°C, quer a 25°C, o teor em polifenóis diminuiu sempre em relação ao valor inicial, sendo essa diminuição mais acentuada quando os sumos foram armazenados a 25°C do que quando o armazenamento ocorreu no frio (4°C) (Figura 3.4).

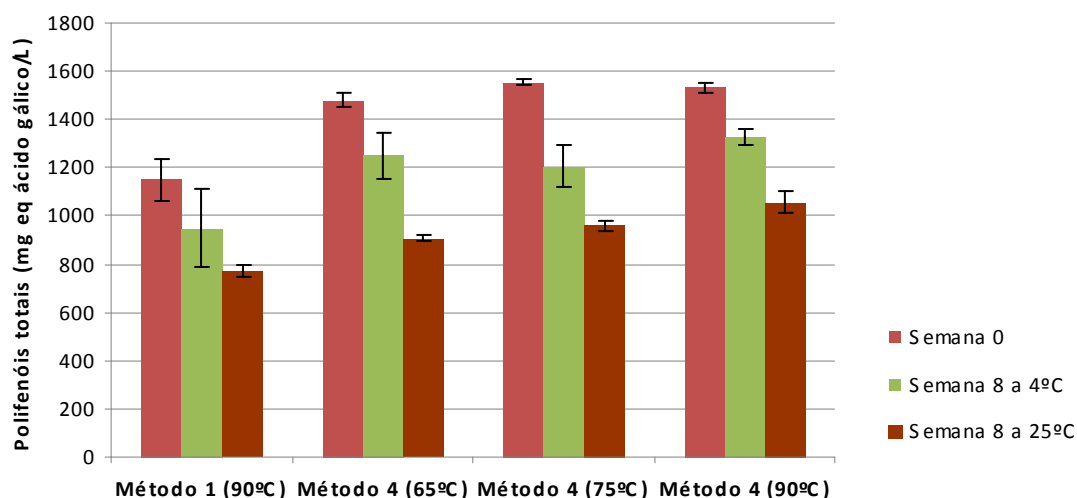


Figura 3.4: Teor em polifenóis dos sumos imediatamente após pasteurização às diferentes temperaturas (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 °C (semana 8 a 25 °C).

O teor em polifenóis dos sumos foi mais elevado do que o encontrado no doseamento anterior, quando se procedeu à escolha do melhor método (Figura 3.3). Esta diferença poderá, por um lado, ter resultado de neste ponto do trabalho se terem utilizado maçãs provenientes de um lote diferente, ou, por outro lado, de durante o aquecimento necessário à pasteurização ter ocorrido a libertação de polifenóis das partículas de polpa que se encontravam em suspensão.

Após o armazenamento das amostras a 4 °C, houve diferenças significativas nos teores em compostos fenólicos dos diferentes sumos em relação aos valores iniciais. Entre os vários sumos, verificou-se que o sumo preparado pelo método 1 tinha o mais baixo teor em fenóis, não se tendo encontrado diferenças significativas nos sumos preparados pelo método 4 e pasteurizados a diferentes temperaturas. Para o caso das amostras armazenadas a 25°C, observaram-se, igualmente, diferenças em relação aos valores iniciais. Também neste caso o sumo preparado pelo método 1 foi o que apresentou o teor em polifenóis mais baixo. Em relação aos sumos preparados

pelo método 4 as perdas foram tanto maiores quanto menores foram as temperaturas de pasteurização.

Assim, durante a fase de conservação ocorreram perdas de polifenóis totais tanto a 4°C como a 25°C, sendo, no entanto, as perdas a 25°C mais acentuadas. É provável que esta diminuição se tenha devido a perdas de ácido ascórbico e de polifenóis que se foram degradando ao longo do tempo de armazenamento. A 4°C estas perdas ocorreram de forma semelhante em todos os sumos, tendo o valor final sido cerca de 80% do valor obtido logo após a pasteurização. No entanto, a 25 °C os sumos pasteurizados a temperaturas mais baixas apresentaram uma percentagem de perda ligeiramente superior à dos sumos pasteurizados a 90 °C (Figura 3.5).

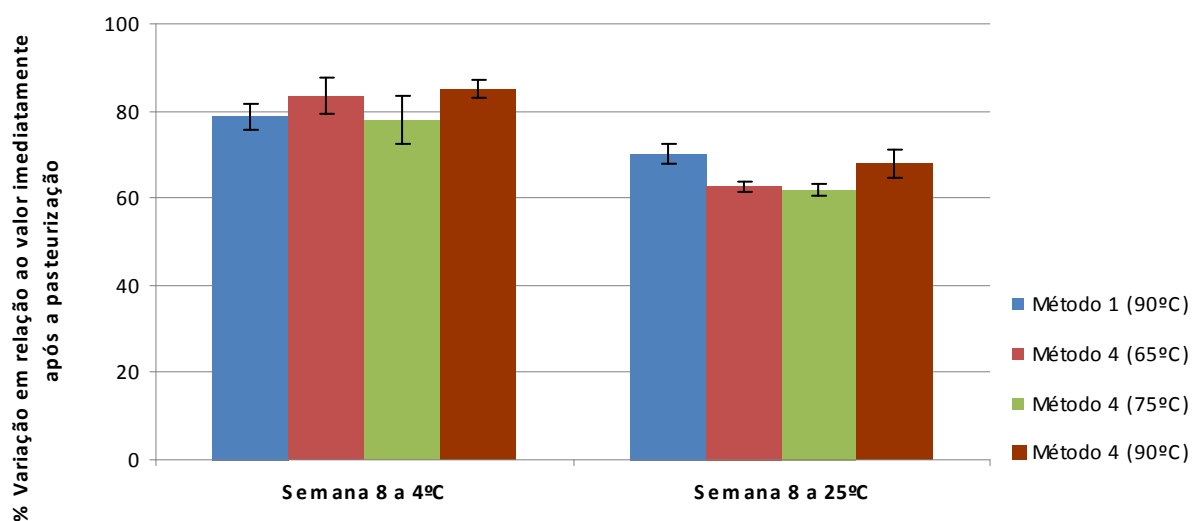


Figura 3.5: Variação percentual em relação ao valor imediatamente após a pasteurização do teor em polifenóis dos sumos imediatamente ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 °C (semana 8 a 25 °C).

A determinação do teor em compostos fenólicos totais nos sumos de maçã aponta no sentido do método 4 pasteurizado a 90°C ser aquele que permite uma melhor extração e uma melhor preservação dos polifenóis da maçã.

3.2.4. Perfil fenólico do sumo

Efectuou-se a quantificação de três compostos fenólicos nos vários sumos antes da pasteurização, imediatamente após a pasteurização e ao fim de dois meses de conservação a 4 e a 25°C. Os polifenóis analisados foram o ácido clorogénico que parece ser dos polifenóis menos sensíveis à ação da PPO (Ye *et al.*, 2007), a epicatequina altamente susceptível à ação desta enzima

(Ye *et al.*, 2007) e a quercetina 3- β -D-glucosido que é um polifenol que se apresenta maioritariamente na casca da maçã (Escarpa & Gonzalez, 1998; Tsao *et al.*, 2003; Tsao *et al.*, 2005; Yuri *et al.*, 2009).

Dos três polifenóis quantificados o ácido clorogénico foi o que se encontrou em quantidades mais elevadas (valores entre 0,045 e 0,114 mg/mL), seguido da epicatequina (valores entre 0,046 e 0,071 mg/mL) e, por fim, da quercetina 3- β -D-glucosido (0,015 e 0,020 mg/mL). Esta tendência está de acordo com as quantidades destes compostos doseados em extratos preparados a partir da totalidade da maçã Golden Delicious de origem nacional (Feliciano *et al.*, 2010).

Conforme já tinha sido observado para os polifenóis totais, o sumo preparado de acordo com o método 1 foi o que apresentou teores mais baixos dos três polifenóis (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8), tendo esta diferença sido mais acentuada para o ácido clorogénico. Para todos os compostos foi possível observar uma diminuição da concentração durante o armazenamento, em especial durante o armazenamento a 25°C. Dos três polifenóis foi a epicatequina aquela que mais se degradou ao longo do período de conservação, em especial quando esta decorreu a 25°C e nas amostras pasteurizadas a temperaturas inferiores. Também na determinação dos fenóis totais se tinha observado, que durante o armazenamento à temperatura ambiente, a maior perda de compostos fenólicos ocorria nas amostras cuja pasteurização tinha sido efectuada a mais baixa temperatura.

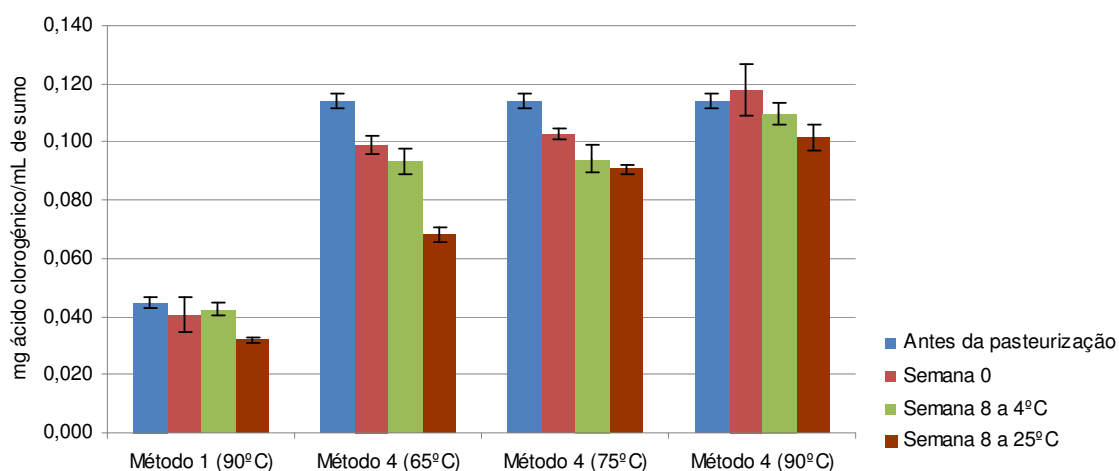


Figura 3.6: Teor em ácido clorogénico (mg/L) nos sumos antes e imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).

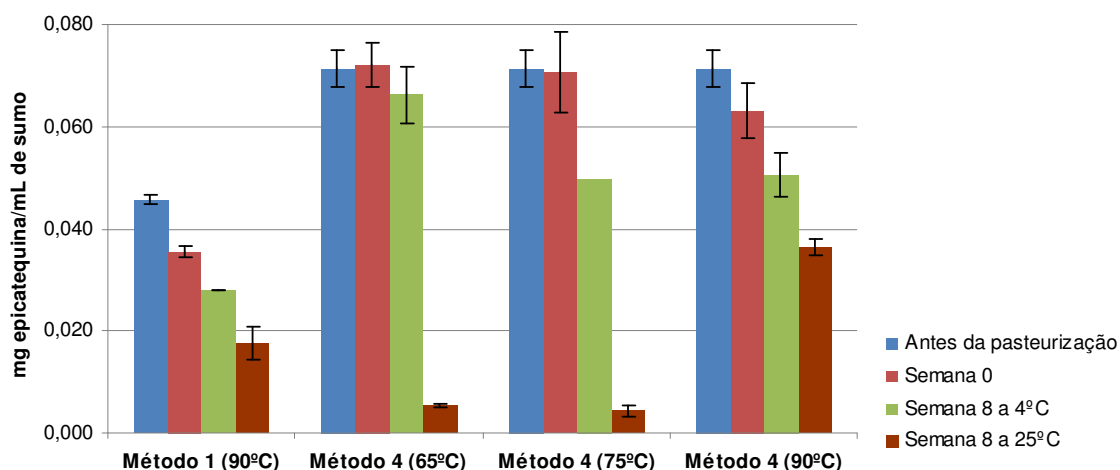


Figura 3.7: Teor em epicatequina (mg/L) nos sumos antes e imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).

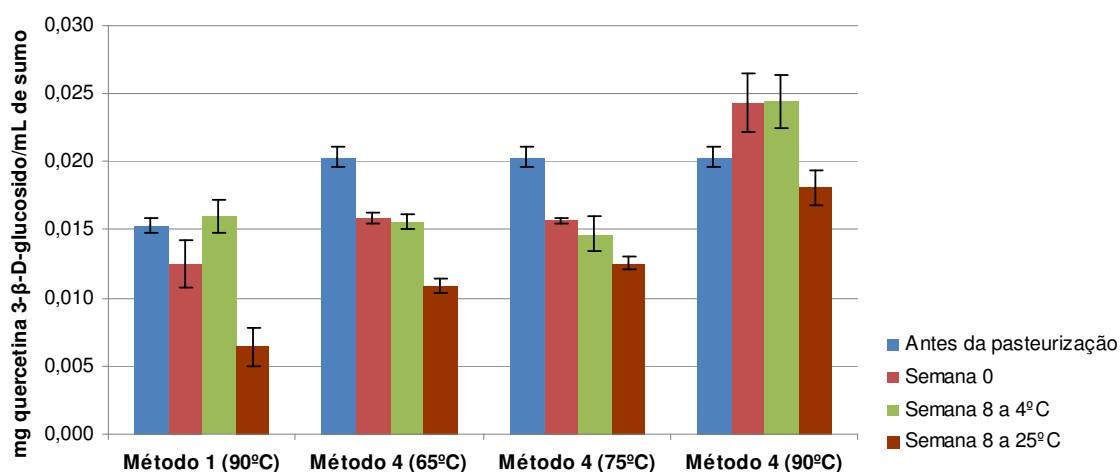


Figura 3.8: Teor em quercetina 3-β-D-glucosido (mg/L) nos sumos antes e imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 ° C (semana 8 a 25 °C).

O sumo preparado pelo método 1 foi o que apresentou logo após a sua preparação e a sua pasteurização (antes da pasteurização e semana 0) o menor teor em todos os compostos analisados. Esta observação sugere que o método 4 é, de facto, mais eficiente a extrair e/ou a proteger os polifenóis extraídos para o sumo da maçã.

A determinação da concentração de três dos compostos fenólicos presentes nos sumos de maçã aponta no sentido do método 4 pasteurizado a 90°C ser aquele que permite uma melhor extração e uma melhor preservação dos polifenóis da maçã.

3.2.5. Escurecimento não enzimático

Logo após a pasteurização e ao longo do armazenamento os diversos sumos em análise mostraram variações na sua cor que se supõe estarem associadas às reacções de escurecimento não enzimático visto que a PPO se encontrava sem actividade detectável. O sumo preparado pelo método 1 apresentou-se logo após a pasteurização mais escuro do que o sumo preparado pelo método 4 independentemente da temperatura de pasteurização (Figura 3.9).

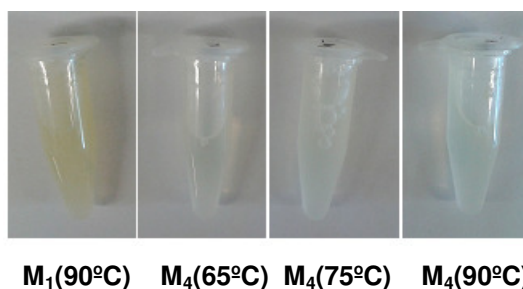


Figura 3.9: Aspecto dos sumos imediatamente após a sua pasteurização. M₁(90°C): Sumo preparado pelo método 1 e pasteurizado a 90°C; M₄(65°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 65°C; M₄(75°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 75°C; M₄(90°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 90°C.

Durante o período de conservação de 2 meses todos os sumos escureceram, sendo, no entanto, esse escurecimento muito mais evidente nos sumos conservados a 25°C (Figura 3.10). Neste processo verificou-se uma diferenciação no escurecimento não enzimático dos sumos produzidos pelo método 4 em função da temperatura de pasteurização. Assim, quanto maior foi a temperatura de pasteurização maior foi o escurecimento não enzimático. Uma possível explicação para este facto é a de se ter trabalhado com sumos turvos contendo micro-partículas de polpa de maçã. Deste modo, quanto maior foi a temperatura a que os sumos foram submetidos maior foi a solubilização dos açúcares e proteínas para a solução levando a uma maior extensão da reacção de Maillard. O estudo de Burdulu & Karadeniz (2003) sobre o escurecimento não enzimático a diferentes temperaturas de conservação apresentou a mesma tendência nos resultados.

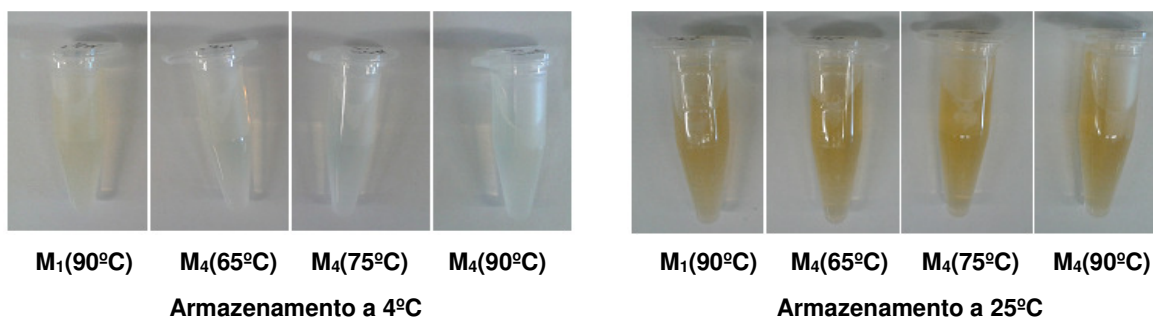


Figura 3.10: Aspecto dos sumos após dois meses de armazenamento a 4°C e a 25°C. M₁(90°C): Sumo preparado pelo método 1 e pasteurizado a 90°C; M₄(65°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 65°C; M₄(75°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 75°C; M₄(90°C): Sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 90°C.

O hidroximetilfurfural (HMF) por ser um produto intermediário das reacções de escurecimento não enzimático tem vindo a ser utilizado como indicador da presença deste tipo de reacções, mesmo antes de se detectar uma alteração visível na cor. Imediatamente após a pasteurização o sumo preparado pelo método 1 apresentou um teor em HMF superior ao de todos os outros sumos. Entre os sumos preparados pelo método 4 não se detectaram diferenças significativas em relação ao teor em HMF. A maior concentração de HMF no sumo preparado pelo método 1 está de acordo com a cor mais escura que este sumo apresentava em relação aos restantes (Figura 3.9). Depois de 2 meses de conservação dos sumos quer a 4, quer a 25°C, houve um incremento significativo da concentração de HMF em todas as amostras, sendo a concentração deste compostos tanto maior quanto maior foi a temperatura de pasteurização. Este aumento foi, no entanto, muito mais expressivo nos sumos armazenados a 25°C (Figura 3.11). Estes resultados também estão de acordo com o aspecto dos sumos após o seu período de armazenamento a 4 e a 25°C (Figura 3.10).

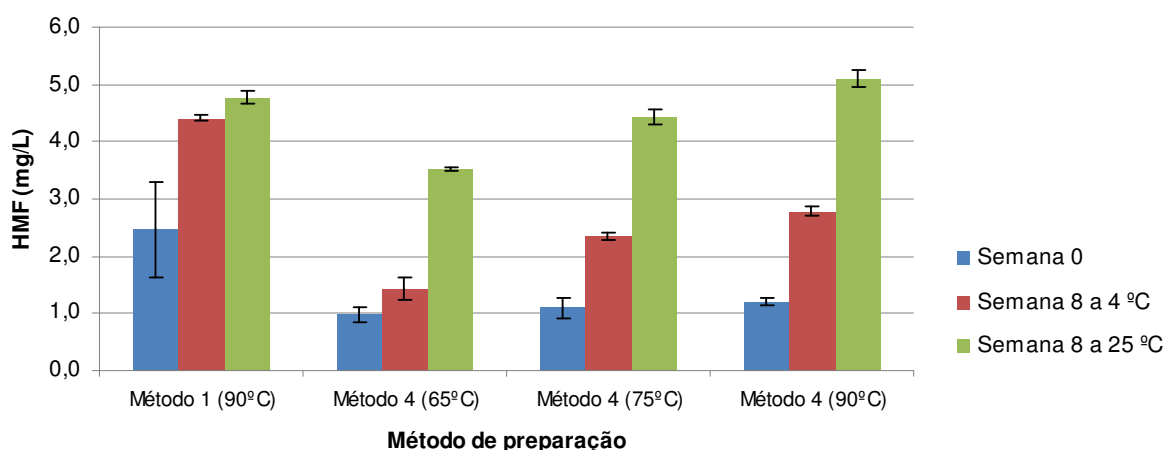


Figura 3.11: Teor em HMF (mg/L) nos sumos imediatamente após a pasteurização (semana 0) e ao fim de dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 °C (semana 8 a 25 °C).

Depois de 2 meses de conservação dos sumos a 4°C, houve um incremento significativo, embora reduzido, da concentração de HMF em todas as amostras, com a concentração mais elevada a ser registada no método 1, seguida do método 4 pasteurizado a 90°C, seguido do método 4 pasteurizado a 75°C e, por fim, o método 4 pasteurizado a 65°C. Nesta altura a concentração de HMF foi 37%, no caso do método 4 pasteurizado a 65°C, a 67%, no caso método 4 pasteurizado a 90°C, inferior nos sumos preparados pelo método 4 em relação ao sumo preparado pelo método 1. Neste caso, quanto maior a temperatura de pasteurização maior foi a concentração de HMF.

A 25 °C o escurecimento não enzimático foi muito mais evidente com os valores de HMF a serem mais elevados no sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 90°C do que no sumo preparado pelo método 1. Em relação ao método 1, o sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 65°C apresentou cerca de menos 26% de HMF, o sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 75°C cerca de menos 7 % e o sumo preparado pelo método 4 e pasteurizado a 90°C cerca de mais 7% de HMF.

O principal factor físico-químico que afeta a velocidade de escurecimento enzimático é a temperatura, o que é confirmado pelos resultados da análise do HMF, um intermediário das reacções de Maillard. O sumo produzido pelo método 1 sofreu um tratamento térmico mais intenso e prolongado, tendo sido aquele que, logo após a pasteurização, apresentou um escurecimento mais evidente (Figura 3.9) e um teor em HMF mais elevado (Figura 3.11). Nesta fase, os sumos extraídos pelo método 4 não apresentaram diferenças significativas na concentração de HMF em função da temperatura de pasteurização aplicada. O que justifica esta diferença acentuada no escurecimento não enzimático deverá ter sido a fase de inativação enzimática. No método 1, a enzima foi inativada após a trituração aquecendo-se o triturado. Ora, neste estado, a superfície de contacto é muito maior e a disponibilidade de açúcares e amino-compostos é muito grande promovendo as reacções de Maillard. No caso do novo método (método 4) a polifenol oxidase é inativada enquanto o fruto está inteiro e sólido o que faz com que a disponibilidade dos reagentes, que estão presos nas membranas celulares, seja muito menor.

Quando se comparou a variação de HMF para cada sumo depois dos dois meses de conservação, verificou-se que para ambas as temperaturas de conservação (4 e 25 °C), o sumo produzido pelo método 1 apresentou o menor aumento de HMF e para os restantes sumos, o aumento foi tanto maior quanto maior foi a temperatura de pasteurização (Figura 3.12).

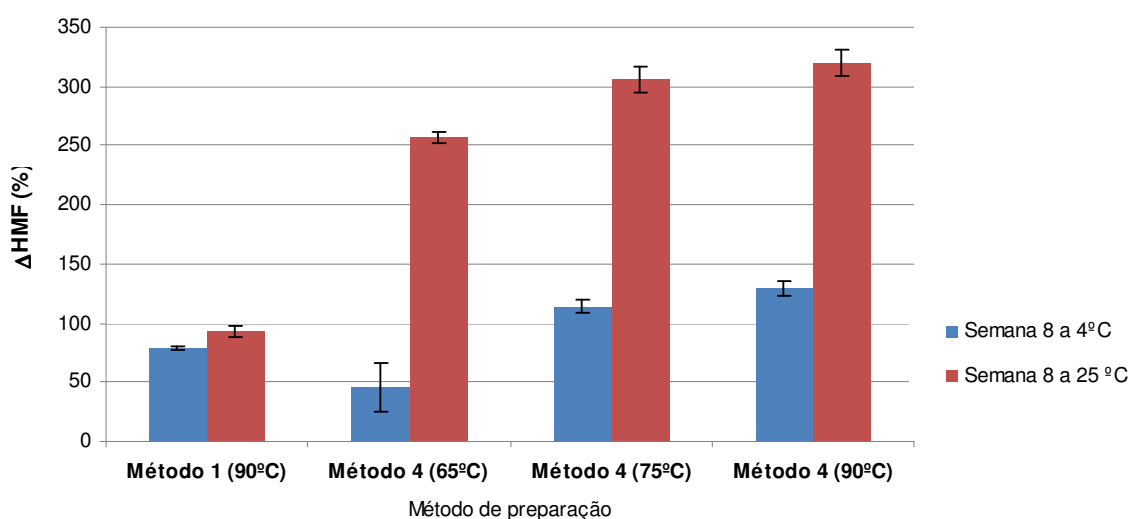


Figura 3.12: Aumento percentual de HMF entre o dia da produção e os dois meses de conservação a 4°C (semana 8 a 4°C) e a 25 °C (semana 8 a 25 °C).

Analisando a Figura 3.12 pode ver-se que no sumo produzido pelo método 1 a variação percentual da concentração de HMF entre o dia da pasteurização e o final da conservação foi inferior à verificada nos sumos produzidos pelo método 4. Esta diferença deve dever-se ao valor mais elevado se regista logo à partida no sumo preparado pelo método 1, o qual, conforme já anteriormente referido, registou grande parte do seu escurecimento na fase de inativação enzimática. Analisando os valores absolutos da concentração de HMF dos sumos processados a temperaturas mais elevadas (método 1 (90°C) e método 4 (75°C) e (90°C) pode ver-se que, no final da conservação a 25°C, a diferença não ultrapassa os 7%, ou seja os valores acabam por se aproximar. Esta observação aponta no sentido de no final do segundo mês de conservação a 25 °C se estar a atingir o máximo escurecimento possível devido ao esgotamento dos reagentes da reacção de Maillard e que grande parte do escurecimento do sumo de maçã produzido pelo método convencional ocorre na fase de inativação enzimática.

CONCLUSÃO

A crescente procura por sumos com menor grau de processamento e elevado valor nutricional, ricos em compostos bioativos e com propriedades sensoriais próximas da fruta fresca, tem motivado a procura de novos métodos de produção, que sejam adaptáveis aos métodos convencionais de produção, e que permitam obter sumos com estas características e com longo período de vida útil.

A estabilidade microbiológica dos sumos constitui um parâmetro essencial para garantir a sua inocuidade e a extensão do seu tempo de prateleira. Esta estabilidade tem tradicionalmente vindo a ser conseguida à custa da aplicação de tratamento térmicos, que eliminem os possíveis microrganismos patogénicos e controlem a proliferação dos microrganismos envolvidos na deterioração dos sumos. Assim, para que um sumo seja estável durante seis a doze meses ele deve passar por uma pasteurização à temperatura de 90°C durante 30 a 60 segundos (Aguilar-Rosas *et al.*, 2007). Se, por um lado, o tratamento térmico acarreta o importante benefício da estabilidade microbiológica por outro lado pode levar a uma diminuição da qualidade nutricional, funcional e sensorial dos sumos de fruta. Com efeito, às temperaturas de pasteurização podem perder-se vitaminas, em especial o ácido ascórbico, nutrientes, como, por exemplo, os açúcares, compostos voláteis e polifenóis, estando favorecidas as reacções de escurecimento não enzimático (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000; Zhu *et al.*, 2009; Patras *et al.*, 2010) podendo ocorrer o aparecimento de sabores e aromas não-naturais (Kato *et al.*, 2003).

Outro importante factor que pode estar envolvido na degradação da qualidade nutricional, sensorial e funcional dos sumos de fruta e, especialmente dos sumos de maçã, é a actividade da enzima polifenol oxidase. Esta enzima é responsável pela degradação e perda dos compostos fenólicos bioativos, perdas de ácido ascórbico e por alterações sensoriais que incluem alteração da cor e formação de aromas não naturais (Komthong *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007). A inactivação desta enzima constitui outro dos importantes benefícios dos tratamentos térmicos.

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidas novas tecnologias alternativas à pasteurização. No entanto, os sumos tratados por estas tecnologias não apresentam uma estabilidade microbiológica tão grande como os sumos tratados termicamente e possuem elevada atividade da PPO. Neste contexto, o presente trabalho surgiu, assim, no âmbito da necessidade de criar um novo método de produção de um sumo de maçã que permitisse obter um produto com elevada qualidade nutricional e sensorial e elevado teor em compostos bioativos e que ao mesmo tempo preenchesse os requisitos de segurança alimentar. A maçã foi o fruto escolhido pelo facto de ser um dos mais produzidos e de ser um fruto que apresenta elevado teor em compostos fenólicos bioativos, cujo impacte positivo na saúde de quem os consome tem vindo a ser documentado através de múltiplos trabalhos que englobam ensaios epidemiológicos, ensaios *in vivo* e ensaios *in vitro* (Pearson *et al.*, 1999; Lu & Foo, 2000; Aprikian *et al.*, 2001; Edenharder, 2003; Leontowicz *et al.*,

2003; Oliveira, *et al.*, 2003; Wolfe *et al.*, 2003; Boyer & Liu, 2004; Yoshiawa *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2010).

Na primeira fase do trabalho testaram-se novos métodos de preparação do sumo de maçã tendo os sumos sido avaliados em relação ao teor em polifenóis totais e à inactivação da PPO. Para poder avaliar de que modo é que os novos métodos constituíam uma mais valia para a qualidade dos sumos os resultados foram sempre comparados com um sumo preparado através de um método convencional (método utilizado a nível industrial).

A trituração da maçã resulta na alteração físico-química das membranas das células do fruto, causando a descompartimentação subcelular, levando ao contacto da PPO com o oxigénio e daí à sua activação. Desta forma a degradação enzimática dos fenóis começa a ocorrer logo nesta fase da preparação do sumo. Desta forma, os métodos testados visaram sempre a inactivação desta enzima na altura da trituração. Para conseguir inactivar a PPO aplicaram-se três estratégias: aquecimento das maçãs a 90°C antes do seu processamento, adição de ácido ascórbico na altura da trituração e aquecimento das maçãs a 90°C antes do seu processamento e adição de ácido ascórbico na altura da trituração em simultâneo. Estas estratégias foram escolhidas tendo por base o conhecimento de que a PPO começa a ser inactivada a temperaturas acima dos 80°C (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000; Tomás-Barberán & Espín, 2001) e de que o ácido ascórbico consegue bloquear as reacções de escurecimento enzimático no seu passo inicial, conduzindo à regeneração do fenol original, embora, após o seu esgotamento este escurecimento possa prosseguir (Robards *et al.*, 1999). Por outro lado, equacionou-se, igualmente, a hipótese da extração a quente poder contribuir para uma maior solubilização dos polifenóis das partículas de maçã, fazendo com que estes ficassem disponíveis no sumo em vez de remanescerem com a polpa no filtrado.

Os resultados obtidos neste primeiro ponto do trabalho evidenciaram que a polifenol oxidase é a principal responsável pela degradação de polifenóis e realçaram a importância desta enzima estar inibida na altura da trituração. Por outro lado, os resultados mostraram, igualmente, que o tratamento térmico, nas condições em que foi efectuado, contribuiu para aumentar o rendimento da extração de polifenóis para o sumo. Combinando os resultados de inactivação enzimática com o teor em polifenóis logo após a trituração, verificou-se que o método em que se combinou o aquecimento das maçãs com a adição de ácido ascórbico foi o que conduziu a resultados mais satisfatórios. Assim, este foi o método escolhido para prosseguir para o segundo ponto do trabalho mantendo sempre a comparação com o método convencional.

Uma vez que são conhecidos os efeitos deletérios do aquecimento sobre a qualidade dos sumos, na segunda fase do trabalho, testou-se a possibilidade de efectuar a pasteurização a temperaturas mais baixas que a temperatura convencional de pasteurização dos sumos de maçã (90°C). Assim, testaram-se as temperaturas de 65, 75 e 90°C tendo a eficiência da pasteurização sido avaliada através da determinação da estabilidade microbiológica dos sumos, imediatamente após a

sua pasteurização e ao longo de dois meses de conservação a 4 e a 25 °C. O impacto do aquecimento na qualidade dos sumos foi avaliado através da determinação do teor em compostos fenólicos totais, do perfil fenólico e do escurecimento não enzimático.

Os resultados obtidos mostraram que quer o sumo preparado pelo método convencional, quer o sumo preparado pelo novo método e pasteurizado a qualquer uma das temperaturas ensaiadas se mostraram estáveis do ponto de vista microbiológico. Assim, em todas as datas em que foram analisados ao longo de dois meses de conservação a 4 e a 25°C, nunca se detectou a presença de *E. coli* e as contagens de microrganismos totais a 30°C e de bolores e leveduras a 25°C foram sempre nulas. A circunstância de mesmo a 65°C se ter conseguido uma boa estabilidade pode prender-se com o fato de a maçã ter sido previamente tratada a 90°C, eliminando os microrganismos que na prática se encontram predominantemente na casca do fruto.

A determinação do teor em compostos fenólicos totais nos sumos de maçã, após pasteurização e ao longo de dois meses de conservação a 4 e a 25°C, mostrou que o sumo preparado pelo novo método e pasteurizado a 90°C foi aquele onde ocorreu uma melhor extração e uma melhor preservação dos polifenóis da maçã. Uma vez que a determinação dos polifenóis totais é um método que pode sofrer interferência de diversos outros compostos presentes no sumo, em particular do ácido ascórbico, tentou-se avaliar a composição fenólica dos sumos recorrendo a uma técnica mais fina. Assim, efectuou-se a análise cromatográfica dos sumos tendo-se quantificado três compostos fenólicos específicos o ácido clorogénico, a epicatequina e a quercetina 3-β-D-glucosido.

Dos três polifenóis quantificados o ácido clorogénico foi o que se encontrou em quantidades mais elevadas, seguido da epicatequina e, por fim, da quercetina 3-β-D-glucosido. Conforme já tinha sido observado para os polifenóis totais, o sumo preparado pelo método convencional foi o que apresentou teores mais baixos dos três polifenóis. Para todos os compostos foi possível observar uma diminuição da concentração durante o armazenamento, em especial durante o armazenamento a 25°C. Também conforme se tinha verificado na determinação dos fenóis totais a maior perda de compostos fenólicos durante o armazenamento ocorreu nas amostras cuja pasteurização foi efectuada a mais baixa temperatura.

O escurecimento não enzimático dos sumos foi avaliado através da concentração em hidroximetilfurfural. Os resultados mostraram que todos os sumos sofreram este tipo de reacções quer durante a conservação a 4°C, quer durante a conservação a 25°C, sendo no entanto este escurecimento muito mais acentuado a 25°C e tanto maior quanto maior foi a temperatura de pasteurização. Os sumos preparados pelo método novo apresentaram, contudo, um escurecimento mais espaçado que o sumo preparado pelo método convencional. Este aspecto pode, igualmente, constituir um ponto a favor do novo método visto que o escurecimento não enzimático pode levar à degradação das qualidades sensoriais do sumo e à evolução de aromas não naturais (Burdulu & Karadeniz, 2003).

As três temperaturas de pasteurização ensaiadas conduziram à mesma estabilidade microbiológica pelo que não podem ser diferenciadas em relação a este efeito. Por outro lado, a temperatura de 90°C foi aquela que deu piores resultados no escurecimento não enzimático sendo, no entanto, a que deu os melhores resultados em relação ao teor em compostos bioativos no sumo. Desta forma torna-se difícil eleger uma temperatura como sendo a mais aconselhada. Contudo, mesmo quando pasteurizado à temperatura de 65°C o sumo preparado pelo novo método conseguiu resultados mais satisfatórios, em relação aos parâmetros em análise, do que o sumo preparado pelo método convencional.

Assim, pode concluir-se que com este trabalho foi possível desenvolver um novo método de extração de sumo de maçã que permite, em relação ao método convencional, obter um sumo de maçã mais rico em compostos bioativos, com igual estabilidade microbiológica, com um mais lento escurecimento não enzimático, com menos passos de produção e temperaturas mais baixas de tratamento.

BIBLIOGRAFIA

Aguiar-Rosas, S. F., Ballinas-Casarrubias, M. L., Nevarez-Moorillon, G. V., Martin-Belloso, O. & Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*, **83**, 41-46.

Alonso-Salces, R. M., Barranco, A., Abad, B., Berrueta, L. A., Gallo, B. & Vicente, F., (2004). Polyphenolic profiles of basque cider apples cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2938-2952.

Aprikian, O., Levrat-Verny, M., Besson, C., Busserolles, J., Remesy, C., & Demigne, C. (2001). Apple favorably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol fed rats. *Food Chemistry*, **75**, 445-452.

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **75**, 199-212.

Awad, M. A. & De Jager, A. (2002). Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in "Elstar" apple skin. *Scientia Horticulturae*, **92**, 256-276.

Awad, M. A., De Jager, A. & Van Westing, L.M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Scientia Horticulturae*, **83**, 249-263.

Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.

Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3**, 228-237.

Bouayed, J. Deußer, H., Hoffmann, L. & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, **131**, 1466-1472.

Boyer, J. & Liu, R.H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, **3(5)**, 1-15.

Bravo, M. N., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas-Boas, L. & Bronze, M. R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, **563**, 84–92.

Buckow, R., Weiss, U. & Knorr, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**, 441-448.

Burdulu, H. S. & Karadeniz, F. (2003). Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. *Food Chemistry*, **80**, 91-97.

Caminiti, I. M., Noci, F., Munoz, A., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A. & Lyng, J. G. (2011). Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chemistry*, **124**, 1387-1392.

Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Nising, A. B. & Hurrell, R. F. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, **26(1-2)**, 128-135.

Chatterjee, P. K., Cuzzocrea, S. & Thiemermann, C. (1999). Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney International*, **56**, 973–984.

Choi, L. H., & Nielsen, S. S. (2005). The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *Journal of Food Quality*, **28**, 13–29.

Chow, Y. N., Louarme, L., Bonazzi, C., Nicolas, J. & Billaud, C. (2011). Apple polyphenoloxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid. *Food Chemistry*, **129(3)**, 761-767.

Chung, F. L., Chen, H. J. C., & Nath, R. G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17(10)**, 2105-2111.

Cohen, E., Birk, Y., Mannheim, C. H. & Saguy, I. S. (1998). A rapid method to monitor quality of apple juice during thermal processing. *Food Science and Technology*, **31(7)**, 612-616.

Diaz, M. N.; Frei, B.; Vita, J. A. & Keaney, J. F. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine*, **337**, 408-416.

Dorantes-Alvarez, L. & Chiralt, A. (2000). Color of minimally processed fruits and vegetables as affected by some chemical and biochemical changes. In: Alzamora, S. M., Tapia, M. S. & Lopez-Malo, A. (Eds.) *Minimally processed fruits and vegetables*. Aspen Publishers, Gaithersburg MA, EUA, 111-126.

Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., Sroka, P. & Tuszyński, T. (2010). The Profile of Polyphenols and Antioxidant Properties of Selected Apple Cultivars Grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, **18**(2), 39-50.

Edenharder, R. & Grunhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tertbutyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*, **540**, 1-18.

Escarpa, A. & Gonzalez, M. C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apples varieties. *Journal of Chromatography*, **823**, 331–337.

Feliciano, E. P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A. T., Figueira, M. E., Duarte, C., M. M., Carvalho, A. & Bronze, M. R. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory Evaluation. *Journal of Functional Foods*, **2**, 35-45.

Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89–111.

Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33**(7), 601-617.

Halliwel, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**(5), 715S-724S.

Hampson, C. R. & Kemp, H (2003). Characteristics of important commercial apples cultivares, *In*: Ferree, D. C. & Warrington, I. J. (Eds.) *Apples, botany, production and uses*. CABI Publishers, Cambridge, MA, EUA, 61-90.

ISO 4833 (2003) *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C*.

ISO 21527-1 (2008) *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*.

Kato, T., Shimoda, M., Suzuki, J., Kawayara, A., Igura, N. & Ayakawa, I. (2003). Changes in the odors of squeezed apple juice during thermal processing. *Food Research International*, **36**, 777-785.

Komthong, P., Katoh, T., Igura, N. & Shimoda, M. (2006). Changes in the odors of apple Juice during enzymatic browning. *Food Quality and Preference*, **17**(6), 497-504.

Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N. & Ueda, J. E. (2002). Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, **96**, 177-185.

Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Cyz, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. & Trakhtenberg, S. (2003). Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(19), 5780-5785.

Lotito, S. B. & Frei, B. (2004). Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**(2), 201–211.

Lu, Y. & Foo, L. Y. (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, **59**(2), 187-194.

Lu, Y. & Foo, L. Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, **68**, 81-85.

Luby, J. J. (2003) Taxonomic classification and brief history, *In*: Ferree, D. C. & Warrington, I. J. (Eds.) *Apples, botany, production and uses*. CABI Publishers, Cambridge, MA, EUA, 1-14.

Luo, Y., Lu, S., Zhou, B. & Feng, H. (2011). Dual effectiveness of sodium chlorite for enzymatic browning inhibition and *Escherichia coli* inactivation on fresh-cut apples. *Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1621-1625.

Maceiras, R., lvarez, E. A. & Cancela, M.A. (2007). Rheological properties of fruit purees: Effect of cooking. *Journal of Food Engineering*, **80**(3), 763-769.

Martinez, M. V., & Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trend in Food Science and Technology*, **6**, 195–220.

Martins I (2007) Tabela da composição de alimentos. Instituto nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 355 p.

Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. & van Boekel, M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends in Food Science & Techonogy*. **11**, 364-373.

McGuire, H. Fan, W. L. & Svetkey, L. P. (2005). Dietary Approaches to Hypertension Management, The DASH Studies. *In Hypertension: A Companion to Brenner and Rector's The Kidney*, 2^a Ed. Elsevier Inc.

Mukhtar, A., Gilani, H. & Bhatti, N (2010). Some nutritional and microbiological aspects of apples of common varieties available for household consumption. *Journal of Animal and Plant Science*, **20**, 253–257.

Noci, F., Riener, J., Walkling-Ribeiro, M., Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2008). Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF).in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of Food Engineering*, **85**,141–146.

NP 2308 (1986) *Microbiologia Alimentar. Regras para a pesquisa de Escherichia coli*.

Oliveira, M. C., Sichieri, R. & Moura A. S. (2003). Weight Loss Associated With a Daily Intake of Three Apples or Three Pears Among Overweight Women. *Nutrition*, **19(3)**, 253-256.

Ortega-Rivas, E., Zárate-Rodríguez, E. & Barbosa-Cánovas, G. V. (1998). Apple juice pasteurization using ultrafiltration and pulsed electric fields. *Food and Bioproducts Processing*, **76(4)**. 193–198.

Özoglu, H. & Bayindirli, A. (2002).Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, **13**, 213-221.

Koşar, M., Göger, F. & Başer, K. H. C. (2008). *In Vitro* Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2369-2374.

Oliveira, M. C., Sichieri, R. & Moura A. S. (2003). Weight Loss Associated With a Daily Intake of Three Apples or Three Pears Among Overweight Women. *Nutrition*, **19(3)**, 253-256.

Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods, mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, **21(1)**, 3-11.

Pearson, D., Tan, C., German, B., Davis, P. & Gershwin, M. (1999). Apple juice inhibits low density lipoprotein oxidation. *Life Science*, **64**, 1919–1920.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(10)**, 4290-4302.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends of Plant Science*, **2**, 152-159.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. & Glover, W., (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, **66**, 401–436.

Rocha, A. M. C. N. & Morais, A. M. M. B. (2001) Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, **12**, 85-90.

Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D. & Drilleau, J. F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4847–4853.

Scalbert, A., Johnson, I. T. & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidantes and Beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**, 215S-217S.

Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart, S., Knorr, D., Schieber, A. & Carle, R. (2007). Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **8**(1), 127-134.

Séjourné, C. (2009). Mechanisms of actions of phytosterols in the intestines. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **44**(3), 132-135.

Serpen, A., & Gökmen, V. (2007). Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chemistry*, **104**, 721–725.

Serra, A. T., Matias, A. A., Frade, R. F. M., Duarte, R. O., Feliciano, R. P., Bronze, M. R., Figueira, M. E., de Carvalho, A. & Duarte, C. M. M. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2- Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*, **2**, 46-53.

Su, S. K. & Wiley, R. C. (1998). Changes in apple juice flavor compounds during processing. *Journal of Food Science*, **63**, 688–691.

Suárez-Jacobo, Á., Rüfer, C. E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X. & Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, **127**, 447-454.

Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F. & Gil, M. I. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Journal of Studies in Natural Products Chemistry*, **23**, 739-795.

Tomás-Barberán, F. A. & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 853–876.

Tsao, R., Yang, R., Sockovie, E. & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4989–4995.

Tsao, R., Yang, R., Young, J. C. & Zhu, H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apples cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6347–6353.

Van der Sluis, A. A., Dekker, M., De Jager, A. & Jongen, W. M. F. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple, effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3606–3613.

Van der Sluis, A. A., Dekker, M., Skrede, G. & Jongen, W. M. F. (2002). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 7211-7219.

Van der Sluis, A. A., Dekker, M., Skrede, G. & Jongen, W. M. F. (2002). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 2. Effect of Novel Production Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2840-2848.

Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van Den Broeck, I. & Hendrickx, M. (1998). High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases. *Journal of food science*, **63(5)**, 1-5.

Williams, R. J., Spencer, J. P., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids, Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 838–849.

Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 609–614.

Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z. & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, **103**, 88-93.

Ye, S., Yao, Y. X., Heng, Z., Du, Y. P., Chen, F. & Wei, S. W. (2007). Polyphenolic compound and the degree of browning in processing apple varieties. *Agricultural Sciences in China*, **6(5)**, 607-612.

Yoshiawa, Y., Sakurai, K., Kawaii, S., Asari, M., Soejima, J., & Murofushi, N. (2005). Comparison of antiproliferative and antioxidant properties among nineteen apple cultivars. *HortScience*, **40**, 1204–1207.

Yuri, J. A. , Neira, A. , Quilodran, A. , Motomura, Y. & Palomo, I. (2009). Antioxidant activity and total phenolics concentration in apple peel and flesh is determined by cultivar and agroclimatic growing regions in Chile. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **7(3&4)**, 132-136.

Zemel G. P., Sims, C A., Marshall, M. R. & Balaban, M. (1990). Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. *Journal of Food Science*, **55**, 562-565.

Zhou, P., Smith, N. L. & Lee, C. Y. (1993). Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 532-536.

Zhu, D., Bp, D., Hl, E. & Zude, M (2009). Evaluation of the non-enzymatic browning in thermally processed apple juice by front-face fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, **113**, 272–279.